

sericologia

Revue des Vers à Soie

Journal of Silkworms

Publiée par la Commission Séricicole Internationale
Published by the International Sericultural Commission
25, quai Jean-Jacques Rousseau - 69350 La Mulatière - France

Directeur Gérant
Rédacteur en Chef
Rédacteur Adjoint

B. MAUCHAMP
G. CHAVANCY
A. FOURNIER

Managing Director
Chief Editor
Deputy Editor

COMITE DE REDACTION **EDITORIAL BOARD**

AKAPANTHU S. (Thaïlande / *Thailand*)
BEAULATON J. (France)
BOSQUET G. (France)
CAPPELLOZZA L. (Italie / *Italy*)
COUBLE P. (France)
DANDIN S.B. (Inde / *India*)
DAS B.C. (Inde / *India*)
DATTA R.K. (Inde / *India*)
DOIRA H. (Japon / *Japan*)
FONSECA T.C. (Brésil / *Brazil*)
FOURCHE J. (France)
FREDDI G. (Italie / *Italy*)
GOLDSMITH M.R. (USA)
HE K. (Chine / *China*)
HORIE Y. (Japon / *Japan*)
IATROU K. (Canada)
JOLLY M.S. (Inde / *India*)
KOBAYASHI M. (Japon / *Japan*)
LEA H. Z. (Corée / *Korea*)

LEGAY J.-M. (France)
LIU S.-X. (Chine / *China*)
LU H.-S. (Chine / *China*)
MANO Y. (Japon / *Japan*)
MAUCHAMP B. (France)
PRUDHOMME J.-C. (France)
REALI G. (Italie / *Italy*)
SHIMURA K. (Japon / *Japan*)
SHIRATA A. (Japon / *Japan*)
SOMASHEKAR T.H. (Inde / *India*)
SONWALKAR T.N. (Inde / *India*)
J. E. MIRANDA (Brésil / *Brazil*)
TAKEDA S. (Japon / *Japan*)
TAZIMA Y. (Japon / *Japan*)
TRENCZEK T. (Rép. tchèque / *Czech Republic*)
VAGO C. (France)
VEY A. (France)
YAMASHITA O. (Japon / *Japan*)

SOMMAIRE – CONTENTS

Mini-revue / Mini-review

- Sex-determination and sex-limited breeds of silkworm *Bombyx mori* L.: their application and relevance in Indian sericulture** 481
 Détermination du sexe et lignées de ver à soie *Bombyx mori* L. limitées au sexe : leur usage et leur place dans la sériciculture indienne 491
 P. SUDHAKARA RAO, H. K. BASAVARAJA, S. N. PALLAVI & S. B. DANDIN

Articles scientifiques / Scientific papers

- Genetic divergence in exotic mulberry (*Morus* spp.) germplasm** 495
 Divergence génétique chez des germoplasmes de mûriers exotiques (*Morus* spp.) 503
 A. TIKADER, A. ANANDA RAO & K. THANGAVELU

- Studies on the factors controlling the pace of development of the tissues hampering the regeneration of *Terminalia arjuna* (Bedd) through cuttings** 507
 Etudes sur les facteurs contrôlant le rythme de développement des tissus empêchant la régénération de *Terminalia arjuna* (Bedd) par boutures 515
 P. S. SINHA, S. BECK, M. C. JOSHI, A. GANGOPADHAYAY, A. K. SINHA & B. R. R. P. SINHA

Rapports techniques / Technical reports

- Introgression of sex-limited marker trait into MDPSY, a promising polyvoltine silkworm strain** 521
 Introgression d'un caractère marqueur limité au sexe chez MDPSY, une souche de ver à soie polyvoltine prometteuse 531
 B. G. P. RAO, CHANDRASHEKHARAIH, IBRAHIM BASHA, H. NAGARAJU & A. K. GOEL

- Isolation and electrofusion of interspecific mulberry protoplasts** 535
 Isolement et électrofusion interspécifique de protoplastes chez le mûrier 543
 P. K. TEWARY & S. OKA

- Seasonal intensity of stem borer *Psilopectera fastuosa* (Coleoptera) infestation on Arjuna (*Terminalia arjuna*) and its control** 547
 Intensité saisonnière de l'infestation d'Arjuna (*Terminalia arjuna*) par le perceur de la feuille *Psilopectera fastuosa* (Coleoptera) et son contrôle 553
 P. K. SINGH, B. D. SINGH & S. K. TIWARI

- Food allocation budgeting in tropical tasar, *Antheraea mylitta* fed on *Terminalia tomentosa*** 557
 Bilan alimentaire chez le tasar tropical *Antheraea mylitta* D. nourri sur *Terminalia tomentosa* 565
 S. S. RATH, RAJ NARAIN, B. C. PRASAD, G. C. ROY & B. R. R. P. SINHA

Notes brèves / Brief notes

- Studies on induced oviposition in tropical tasar silkmoth, *Antheraea mylitta* Drury . 569**
 Etudes sur l'induction de la ponte chez le papillon tasar tropical, *Antheraea mylitta* Drury 573
 RAJ NARAIN, B. C. PRASAD, O. P. DUBEY, B. R. R. P. SINHA & K. THANGAVELU

- The discovery of a mulberry fossil and its comparative studies with its modern relative species 577**
 Découverte d'un fossile de mûrier et études comparatives avec les espèces modernes parentes 581
 KUAI YUAN ZHANG & WANG BAO ZHONG

- Bibliographie / Bibliography 583**
 Sériciculture générale / General sericulture 585
 Mûrier / Mulberry 587
Bombyx mori : élevage, nutrition, pathologie / *Bombyx mori*: rearing, feeding, pathology . 589
 Séricigènes non-mûriers : élevage, nutrition, pathologie / Non-mulberry silkworms: rearing, feeding, pathology 593
 Vers à soie : génétique / Silkworms: genetics 595
 Vers à soie : physiologie, biochimie / Silkworms: Physiology, biochemistry 599
 Vers à soie : oeufs, embryologie / Silkworms: eggs, embryology 605
 Vers à soie : glandes séricigènes / Silkworms : silk glands 607
 Soie / Silk 609

SEX- DETERMINATION AND SEX-LIMITED BREEDS OF SILKWORM *BOMBYX MORI* L. : THEIR APPLICATION AND RELEVANCE IN INDIAN SERICULTURE

P. SUDHAKARA RAO*, H. K. BASAVARAJA, S. N. PALLAVI & S. B. DANDIN

Central Sericultural Research and Training Institute - Mysore, 570008 (India)

INTRODUCTION

Utilization of hybrid vigour in the silkworm through introduction of F1 hybrids in the sericulture for commercial exploitation has heralded a new era in most of the sericulturally advanced countries. The exploitation of hybrid vigour has made a remarkable progress in increasing the cocoon productivity. The superiority of hybrids over parental strains is undoubtedly due to the high magnitude of heterosis for most of the quantitative traits (Harada, 1961).

Sex-determination in the silkworm is controlled by simple and stable mechanism. The chromosome formula for both the sexes of silkworm was established by Tanaka (1916) as 'ZW' for the female (Heterogametic) and 'ZZ' for the male (Homogametic). Hashimoto (1933) demonstrated that the female sex is determined by W chromosome in the silkworm. Tazima (1941) translocated a piece of chromosome containing larval marking gene to "W" chromosome; that determines the female sex and developed a auto sexing breed, so that all larvae having mark are females. Thus sex-determination has become indispensable in silkworm breeding, because all present day silkworm rearers culture only hybrids to exploit heterosis for cocoon production for which accurate isolation of male and female is essential for better egg production with reduced cost (Doira, 1978).

Keywords: Sex-determination, F1 hybrids, Silkworm.

EVOLUTION OF SEX-LIMITED BREEDS

Since the discovery of sex determining mechanism by Tanaka (1916), many genes responsible for morphological traits have so far been mapped on the Z chromosome, but no gene of morphological significance has been found on the W chromosome. This discovery not only demonstrated the female determining nature of the W chromosome but lead to the discovery of sex-limited strains of practical use. In the translocated strain obtained by Tazima (1941), larvae which carried the markings were invariably females, while all non marked larvae were males, thus allowing very easy sex separation at larval stage. Since the manifestation of larval markings as found only in one sex, such strains were named as sex-limited strains. However, such females which carried translocated W chromosome were not hardy enough owing to the hyperploidy of translocated fragment. Tazima (1954) attempted to remove this anomaly to use them effectively in commercial egg production. After repeated irradiation of translocated strain, he succeeded in eliminating the "surplus" part of the translocated second chromosome thus leaving only a small fraction containing gene for larval marking (+P). Tazima *et*

* Address for correspondence

al., (1951) induced translocation between W chromosome and the 10th chromosome, the later carrying dominant allele for black egg colour which is recessive to white egg-2 (w2). The females of translocated strain when mated to white egg males gave rise to black coloured eggs which were always females and white eggs, which were always males. Tazima also devised a automatic sexing machine in co-operation with an Engineer, Mr. Oshitani (Oshitani *et al.*, 1957) that had photo electric tubes which enabled to discord female eggs before hatching. After these initial discoveries, many sex-limited strains with larval markings have been synthesized (Hashimoto, 1948).

Kimura *et al.*, (1971) succeeded in breeding a new strain whose yellow cocoons are females and white cocoons grew to males. This team translocated the yellow blood gene (y) of the 2nd chromosome on to the W chromosome through X- ray irradiation of female pupae at 18000 R per hour, irradiation time 20 minutes and dose 6000 R. The translocated y gene co-exists with the cocoon colour gene (c) on the 12th chromosome, thus producing yellow blood and yellow cocoons. They named the new strain as "sex-limited yellow cocoon " of silkworm. This discovery was thus an out come of great endeavors. The physiological defects in the females and the structure of the translocated chromosome in sex-limited yellow cocoon strain were investigated (Niino *et al.*, 1987). Backcrossing experiments of the sex-limited yellow cocoon strain showed that the loci of grey egg (Gr), yellow blood (y) and inhibitor of lemon (*i*-lem) genes of 2nd chromosome also translocated on to the W chromosome.

However, refinement in selection and breeding procedures improved the viability of the females (Yamamoto, 1989). Thus, sex-limited breeds became a reality in Japan and opened up new horizon in the application of fundamental genetic principles to the commercial use in sericulture.

SEX-LIMITED BREEDS AND THEIR RELEVANCE IN INDIAN SERICULTURE

In India, the silkworm varieties used by farmers at present are mostly indigenous polyvoltine females crossed with developed bivoltine strains (Nagaraju, 1996). For production of F1 hybrids, parental stocks are supplied to farmers to raise "seed cocoons" and Government / Licensed seed producers procure the seed cocoons to prepare hybrids. The sex-separation of male and female to prevent the mating of the same parental variety is a very important task in the preparation of correct hybrid eggs. The separation of male and female is done by employing sexing at larval / pupal stage. On the ventral side of the larval abdomen, a pair of tiny spots (Herald's glands) in the male and four whitish spots (Ishiwata's glands) in the females could be visible only after passing fourth moult. In case of female pupae, the abdomen is broad with a marking on 8th segment. Male is small in size with a narrow abdomen and a dot like mark on the 8th segment and is difficult to be distinguished with naked eye and requires skilled persons to ensure high degree of accuracy. This method often causes error and some times injury to the pupae. At grown up stage female larvae or cocoons are generally heavier than the males. Such sex-separation based on cocoon weight also has some error and even 5% selfing (mating of male and female moths of same variety) causes great problems in hybrid preparation. Sex-separation at pupal stage based on external markings on the abdomen involves cutting open each cocoon rendering loss of seed cocoon as they are not suitable for direct reeling. Thus Sex-limited cocoon colour breeds offer a simple and precise mechanism for sex-separation and correct preparation of hybrids.

In India, bulk of the raw silk is produced from the hybrid between Polyvoltine female and bivoltine breeds (Datta *et al.*, 2001). During the preparation of F1 layings with normal silkworm strains, sexing at pupal stage is not being practiced at commercial egg production centers in India.

As such moths are allowed to emerge and almost 50% of polyvoltine (sex ratio being 50:50) males are discarded. Like wise 50 % of bivoltine female moths are discarded as reciprocal crosses are not prepared owing to the known genetic reasons (Nakada, 1972; Murakami, 1989).

Table 1. Avoidable loss in preparation of cross-breed by using sex-limited races in India.**Tableau 1. Pertes évitables dans la préparation de croisements en utilisant des races limitées au sexe en Inde.**

Particulars / Caractéristiques	Amount in Rs. / Somme en Roupies Qty. in No. / Qté en nbre
I. Pure Mysore / Female parent / I. Parent femelle Pure Mysore :	
Requirement of cross-breed layings per year / Besoin en pontes pour les croisements par année	330 million
Cocoons required (@ 25% recovery rate (No) / Cocons nécessaires (à raison d'un taux de récupération de 25 % en nbre)	1320 million
50% of males not used in seed production centers / 50 % de mâles non utilisés dans les centres de grainage	660 million
Weight of male cocoons (@ 1000 cocoons weighs./kg) / Poids des cocons mâles à raison de 1000 cocons / kg	660 MT
Value of male cocoons @ Rs. 180/Kg / Valeur des cocons mâles à raison de 180 Rs / Kg	118.8 million
Amount recovered from sale of pierced cocoons(@ Rs180/(4000 nos weighs per a Kg) Somme récupérée par la vente de cocons percés (à raison de 180 Rs / pour 4000 cocons pesés par kg)	29.7 million
Net loss / Perte nette	89.1 million
II. NB4D2 / Bivoltine male parent / II. Parent mâle bivoltin NB4D2 :	
Requirement of seed cocoons (no) (50% of females) / Besoin en cocons de grainage (nbre) (50 % de femelles)	660 million
50% females not required / 50 % de femelles non nécessaires	330 million
Weight of female cocoons (@ 700 cocoons weighs / kg) / Poids des cocons femelles (à raison de 700 cocons pesés par kg)	471.43 MT
Value of female cocoons (@Rs.250/kg) / Valeur des cocons femelles (à raison de 250 Rs / kg)	117.9 million
Amount recovered by sale of pierced cocoons (@ Rs.250/(2500 nos weighs per a kg) Somme récupérée par la vente de cocons percés (à raison de 250 Rs / (pour 2500 cocons par kg)	29.5 million
Net loss / Perte nette	88.4 million
III. Net grand loss / III. Perte nette totale	177.5 million

Source: Mundukur *et al.*, 2002

Table II. Performance of Pure Mysore sex-limited and Pure Mysore strains.

Tableau II. Performance de souches Pure Mysore limitée au sexe et de Pure Mysore.

Silkworm strain	Male /Female	Yield/100 dfls		Cocoon weight (g)	Shell weight (g)	Shell ratio (%)
		Number	Weight (kg)			
<i>Souche de ver à soie</i>		<i>Rendement / 100 pontes saines</i>				
	<i>Mâle / Femelle</i>	<i>Nombre</i>	<i>Poids (kg)</i>	<i>Poids du cocon (g)</i>	<i>Poids de la coque (g)</i>	<i>Richesse soyeuse (%)</i>
Pure Mysore (Sex-limited)	Males / Mâles	17,500	16.61	0.935	0.160	17.3
Pure Mysore (limitée au sexe)	Females / Femelles	16,566	19.43	1.160	0.167	14.4
	Total / Mean Total / Moyenne	34,066	36.04	1.047	0.163	15.7
Pure Mysore (Normal)	Males / Mâles	17,250	14.58	0.850	0.112	13.1
	Females / Femelles	14,950	15.72	1.040	0.115	10.9
	Total / Mean Total / Moyenne	32,200	30.30	0.940	0.113	12.7

*Data are the mean of three rearing trials conducted during April-May, May-June and June-July, 1986. / Les données sont la moyenne de trois essais d'élevage réalisés pendant avril - mai, mai-juin et juin-juillet 1986.

Source : Nagaraju *et al.*, 1987.

Presently India required 330 millions of Polyvoltine $\times$ bivoltine hybrids per year (Mundukur *et al.*, 2002). It in turn needs about 1320 million female parent (Pure Mysore) seed cocoon. Out of this, about 660 million seed cocoons (50% being males) were wasted by allowing males for eclosion. Weight of these male cocoons estimated to be 660 MT. The value of these seed cocoons would be about Indian Rupees 118.8 million. After emergence, the sale price of pierced cocoons would realise about Rupees 29.7 million. It amounts to a net loss of about Rs. 89.1 million. Like wise in bivoltine parent (Bivoltine- A single male moth is used twice in commercial egg production centers) again 50% of female moths were wasted. The net loss incurred is estimated to be Rs 88.4 million. If sex-limited breeds are used the total loss of about Rs 177.5 million could be avoidable (Table I).

Table III. Performance of CSR 8 in the laboratory (mean of 5 trials).

Tableau III. Performance de CSR 8 en laboratoire (moyenne de 5 essais).

Breed	Egg/ Dfl. (No)	Hatching (%)	Larval period		Survival (%)	Cocoon yield (kg)	Cocoon weight (g)	Shell weight (g)	Shell ratio (%)	Raw silk (%)	Filament length (m)	Denier (d)	Reelability (%)	Neatness (p)
			Total D : h	V age D : h										
Lignée	Nbre d'oeufs / pontes saines	Eclosion (%)	Durée larvaire		Survie (%)	Rendement en cocons (kg)	Poids du cocon (g)	Poids de la coque (g)	Richesse soyeuse (%)	Soie grège (%)	Longueur du filament (m)		Dévidabilité (%)	Netteté (p)
			Totale J : h	5è âge J : h										
CSR8	538	95.6	23:10	6 :09	Female 88.5	15.42	1.848	35.3	19.1	16.2	871	3.10	80	93
					Male 93.9	14.72	1.625	37.0	22.8	17.9	984	2.85	82	94
					91.2	15.07	1.737	36.2	21.0	17.1	928	2.98	81	94
NB4D2	546	96.2	23:09	6 :10	92.4	15.58	1.735	35.6	20.5	16.4	865	2.96	80	93
% improvement % d'amélioration	-5.13	-0.62	0.18	-1.16	-1.30	-3.27	0.09	1.54	2.20	3.96	7.23	0.51	1.25	0.54

Source: Datta *et al.*, 2001.

Table IV. Performance of CSR8 with Pure mysore (PM) race (mean of 5 trials).

Tableau IV. Performance de CSR8 avec la race Pure Mysore (PM)(moyenne de 5 essais).

Hybrid	Egg/ DFL No.	Hatching (%)	Larval period		Survival (%)	Cocoon yield (kg)	Cocoon weight (g)	Shell weight (cg)	Shell ratio (%)	Raw silk (%)	Filament length (m)	Denier (d)	Reclability (%)	Neatness (p)
			Total larval D:H	V age Dur. duration D: H.										
Hybride	Nbre d'oeufs / Ponte saine	Eclosion (%)	Durée larvaire		Survie (%)	Rendement en cocons (kg)	Poids du cocon (g)	Poids de la coque (cg)	Richesse soyeuse (%)	Soie grège (%)	Longueur du filament (m)		Dévidabilité (%)	Netteté (p)
			Durée larvaire totale J : H	Durée du 5ème âge J : H										
PM × CSR8	482	96.1	23 : 15	7 :00	95.9	19.23	1.99	35.6	17.9	13.5	900	2.51	76	89
PM × NB4D2	475	95.7	23:12	6:21	95.7	19.52	2.04	35.3	17.3	12.7	875	2.58	75	87
% improvement % d'amélioration		0.4	0.5	1.8	0.2	- 1.5	- 2.5	0.9	3.5	6.0	2.9	- 2.7	1.3	2.3

Source : Datta *et al.*, 2001

Table V. Performance of selected new multi × bivoltine (sl) hybrids.

Tableau V. Performance de nouveaux hybrides multi × bivoltins (sl) sélectionnés.

Hybrid	ERR/10,000 larvae (no.)	Cocoon weight (g)	Shell weight (g)	Shell ratio (%)	Filament length (m)	Raw silk (%)	Reelability (%)
Hybride	ERR / 10 000 larves (nbre)	Poids du cocon (g)	Poids de la coque (g)	Richesse soyeuse (%)	Longueur du filament (m)	Soie grège (%)	Dévidabilité (%)
BL24 × CSR19	9677	1.719	0.317	18.41	913	13.65	82.80
BL24 × B72	9710	1.814	0.362	19.93	811	14.06	83.75
96A × B72	9422	1.803	0.367	18.95	713	13.72	82.94
BL67 × CSR5	9044	1.880	0.387	20.60	903	13.73	85.08
BL67 × B72	9199	1.861	0.363	19.76	848	16.39	84.08
PM × NB4D2							
(Control / Témoin)	9177	1.745	0.309	17.51	608	11.97	81.56
CD at 5%	228.3 **	0.1*	0.03**	0.92**	82.13**	0.88**	NS

ERR: Effective Rate of Rearing / *Taux Effectif d'Élevage*.

Source: Sudhakara Rao *et al.*, 2002

In case of sex-limited larval marking polyvoltine strains, larvae with markings are invariably females. Males are without any markings and can be easily discarded at 3rd instar itself. In case of bivoltine strains with sex-limited cocoon colour females are always yellow in colour; whereas males are white in colour. Hence by simple visual observation we could separate male cocoons and females could be sent to reeling directly before emergence. Thus lot of labour and money could be saved by using sex-limited strains at Commercial egg production centers and P1 seed cocoon producers level. In spite of these clear advantages of sex-limited strains, they were not in use so far in India for want of suitable sex-limited strains or due to the prevailing belief that females of the sex-limited strains are less viable than normal females. Systematic studies conducted by Nagaraju *et al.*, (1988) showed that the sex ratio and female viability in sex-limited strains does not differ from that of normal strains. However females in normal strain are also slightly less viable than males (Strunnikov, 1996). Yamamoto (1989) also demonstrated that through systematic breeding and selection procedures same level of survival rate in females can be obtained in sex-limited cocoon colour breeds too with that of ordinary races.

In India, Sengupta, (1968) transferred the sex-limited larval markings of Sanish 18, a Russian sex-limited strain to J112 and C110 bivoltine strains. Keeping in view of this, Polyvoltine strains C.Nichi, HS6 and Pure Mysore that are used in India with sex-limited larval markings were studied for possible differences in survival and yield (Iyengar *et al.*, 1975). The studies revealed that females are slightly less viable and that deleterious effect of hyperploidy is not severe. Later polyvoltine strain nearer to Pure Mysore breed with sex-limited larval markings were developed. (Sreeramareddy and Ananthanarayana, 1984; Nagaraju *et al.*, 1988). The systematic studies made on the sex-limited strain

Pure Mysore showed that it is better than normal Pure Mysore either as pure line (Table II) or as a hybrid when crossed with high yielding bivoltine strains. (Nagaraju *et al.*, 1989). Mundukur *et al.*, (1999) developed a Polyvoltine breed SL-KSPM with sex-limited larval markings similar to Pure Mysore and studied its grainage performance with NB4D2 in large scale and noted that the performance is similar to normal Pure Mysore. Bhargava *et al.*, (1993) evolved seven sex-limited larval / cocoon colour breeds and reported that there is no difference between these breeds and normal one. Datta *et al.*, (1997) evolved a robust bivoltine hybrid CSR18 × 19 with sex-limited larval markings and it was authorised by Central Silk Board, Government of India for commercial exploitation. Ravindra Singh *et al.*, (2001) evolved productive polyvoltine breeds like MR1 (SL) and BL 27 (SL) with sex-limited cocoon colour. Datta *et al.*, (2001) evolved a bivoltine sex-limited cocoon colour breed (CSR8) similar to that of Indian popular breed NB4D2. These studies indicated that there is no female mortality in sex-limited breed (Table III & IV). This breed is under Race authorisation test at National level. Sudhakara Rao *et al.*, (2001) introduced sex-limited cocoon colour to productive bivoltine breeds *i. e.* CSR2, CSR5, CSR18, CSR19 and B72 during 1997 and evolved the sex-limited cocoon colour breeds. The combining ability studies between newly evolved polyvoltine breeds like BL23, BL24, BL67 and 96A with above sex-limited bivoltine cocoon colour breeds as male component shown significant differences for important economic traits when compared to normal PM × NB4D2. The performance of short listed hybrids is presented in Table V.

Thus sex-limited strains assume special significance in Indian sericulture to use as male component with Polyvoltine females to produce F1 hybrids (Sudhakara Rao *et al.*, 2002) at reduced cost of production and correct preparation.

REFERENCES

- BHARGAVA S. K., THIAGARAJAN V., RAMESH BABU M. & NAGARAJU B. (1993) Evolution of bivoltine races of silkworm with sex-limited expression of larval markings and cocoon colours Indian J. seric., 32 (2) :234-237
- DATTA R. K., KISHORE KUMAR C. M., BASAVARAJAH K. SURESH KUMAR N. & NIRMAL KUMAR S. (1997) Evolution of Robust hybrid of bivoltine silkworm *Bombyx mori* L. for tropics Proc. of XVIIth congress of the Int. seric. commission, Brazil: 22-26, April 1997.
- DATTA R. K., RAO D. R., JAYASWAL K. P., PREMALATHAV., SINGH R. & KARIAPPA B. K. (2001) Heterosis in relation to combining ability in multivoltine and bivoltine strains of silkworm *Bombyx mori* L. Indian. J. Seric., 40 (1): 1-6
- DATTA R. K., BASAVARAJA H. K., MAL REDDY N., SURESH KUMAR N., JOGE P.G., KALPANA G. V., PALIT A. K. & JAYASWAL K. P. (2001) CSR 8- Sex-limited bivoltine breed: A boon for graineurs. Indian silk. 39 (11) :5-7
- DOIRA H. (1978) Genetic stock of the silkworm. In "The silkworm is an important laboratory tool" (Ed) Tazima, Y. Kodamsha Limited. Jpn. pp 252-254
- HARADA C. (1961) Heterosis of the quantitative characters in the silkworm. Bull. Seric. Exp. stn., 17(1): 50-52
- HASHIMOTO H. (1933) Genetical studies on the tetraploid female in the silkworm. Bull. Seric. Exp. Stn., 8: 359-381
- HASHIMOTO H. (1948) Sex-limited zeebra, an x-ray mutation in the silkworm, J. Seric. Sci. Jpn., 16 : 62-64
- IYENGAR M. N. S., GANESH N.K. & TIKOO B.L (1975) Studies on the differential viability of sexes in the sex-limited breeds of silkworm (*Bombyx mori* L) use in India. Indian J. Seric., 14(1) : 6-11
- KIMURA K., ARADA & AOKI H. (1971) Studies on the W translocation of yellow blood gene in the silkworm. Jpn. J. Breed., 21: 199-203.

- MUNDUKUR K. N. R., MURTHY M., GUPTA K. N. RAO S. K., RAGHURAMAN R. & DANDIN S. B. (1999) Breeding of sex-limited Polyvoltine strain, SL-KSPM in silkworm, *Bombyx mori* L. XVIII congress of International Sericultural Commission, Cairo, Egypt, 12-16 Oct 1999
- MUNDUKUR K. N. R., MURTHY M. M., GUPTA K. N., MURTHYRAO S. K., RAGHURAMAN R. (2002) Sex-limited races of silkworm *Bombyx mori* L. : As useful grainage tools, Indian silk., 41(2): 13-15.
- MURAKAMI A. (1989) Genetical studies on tropical races of silkworm *Bombyx mori* L. with special reference to cross breeding strategy between tropical and temperate races 2. Multivoltine silkworm strains in Japan and their origin., JARQ., 23 :123-127
- NAGARAJU J., RAVINDRA SINGH & PREMALATHA V. (1988) Sex-ratio in normal and sex-limited strains of silkworm *Bombyx mori* L. Curr.sci., 58 :324-326
- NAGARAJU J., PREMALATHA V., SINGH R., NAOMANI M. K. R & JOLLY M. S. (1989) Isolation of a Polyvoltine strain with sex-limited larval markings in silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombyciidae) Sericologia., 29 (4): 495-502
- NAGARAJU J. (1996) Sex-determination and sex-limited traits in the silkworm, *Bombyx mori* :Their applications in sericulture Indian. J. seric., 35 (2) :83-89
- NAKADA T. (1972) Investigations of sex-limited hereditary cocoon weight in silkworm, *Bombyx mori* J. Fac. Agric., Hokkaido Univ: 57 (1) :40-50
- NIINO T. & EGUCHI R., SHIMAZAKI A. & SHIBUKAWA A. (1987) Defects and structure of translocated chromosome in the sex-limited yellow cocoon strain of silkworm, *Bombyx mori* J. seric. Sci. Jpn., 56: 240-246
- OSHITANI Y. TAZIMA Y. & URABE S. (1957) Automatic sexing machine for silkworm eggs .Rep. Silk Sci. Rep. Inst, Tokyo, 5 : 62-77
- RAVINDRA SINGH, PREMALATHA V., RAO D. R, KARIAPPA B. K, JAYASWAL K. P. & DATTA R. K. (2001) Line $\times$ Tester analysis in sex-limited strains of Mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. with coloured cocoons Indian J. Seric., 40 (1): 39-43
- SENGUPTA K.(1968) Sex-limited characters in two races of *B. mori*. Indian J. seric., 1:79-86
- SREERAMA REDDY G. & ANANTHANARAYANA S.R. (1984) Evolution of new multivoltine strains of silkworm, *Bombyx mori* L., with sex-limited larval markings. Sericologia., 24 (3): 434-435
- STRUNNIKOV V. A.(1996) Control over reproduction, sex and heterosis of the silkworm, Harwood; Academic Publishers, Moscow
- SUDHAKARA RAO P., BASAVARAJA H. K., NISHITHA NAIK V., JAYASWAL K. P., REKHA M. & DATTA R. K. (2001) Evaluation of combining ability in hybrids between Polyvoltine and bivoltine (sex-limited cocoon colour) breeds of *Bombyx mori* L. Indian J. seric., 40 (2) : 163-167
- SUDHAKARA RAO P., REKHA M., NISHITHA NAIK V., PALLAVI S. N. & MAHALINGAPPA K. C. (2002) Hybrid vigour in Polyvoltine $\times$ bivoltine (sex-limited cocoon colour) hybrids of *Bombyx mori* L., Int. J. Ind. Entomol., 4 (1) : 37-41
- TANAKA Y.(1916) Genetic studies in the silkworm. J. coll. Assoc. Sappro, 7:129-255
- TAZIMA Y. (1941) A simple method of sex-discrimination by means of larval markings in *Bombyx mori* L. J. Seric. Sci. Jpn., 12: 184-188
- TAZIMA Y., OHTA N. & HARADA C. (1951) On the discrimination method by colouring gene of silkworm eggs. Induction of translocation in between the W and the 10th chromosome. Jpn. J. Breed., (1) : 47-50.
- TAZIMA Y. (1954) Mechanism of sex-determination in the silkworm, *Bombyx mori*. Proc. Int. Cong. Genet. Cytol (suppl), 6: 958-960
- YAMAMOTO T. (1989) Breeding of sex-limited yellow cocoon races of silkworm by chromosome manipulation. Farming Japan., 23 (5) : 42-48

DETERMINATION DU SEXE ET LIGNEES DE VER A SOIE *BOMBYX MORI* L. LIMITEES AU SEXE : LEUR USAGE ET LEUR PLACE DANS LA SERICICULTURE INDIENNE

P. SUDHAKARA RAO*, H. K. BASAVARAJA, S. N. PALLAVI & S. B. DANDIN

Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore 570008 (Inde).

INTRODUCTION

L'utilisation de la vigueur hybride chez le ver à soie par l'introduction d'hybrides F1 dans la sériciculture représente une nouvelle ère dans la plupart des pays avancés sur le plan séricicole. L'exploitation de la vigueur hybride a permis de remarquables progrès dans l'augmentation de la productivité du cocon. La supériorité des hybrides par rapport aux souches parentales est sans aucun doute due à l'amplitude élevée de l'hétérosis pour la plupart des traits quantitatifs (Harada, 1961).

La détermination du sexe chez le ver à soie est contrôlée par un mécanisme simple et stable. Tanaka a établi la formule chromosomique pour les deux sexes du ver à soie (1916) en tant que "ZW" pour la femelle (hétérogamétique) et "ZZ" pour le mâle (homogamétique). Hashimoto (1933) a montré que chez le ver à soie le sexe de la femelle est déterminé par le chromosome W. Tazima (1941) a transloqué un segment de chromosome contenant le gène de marquage larvaire sur le chromosome "W" qui détermine le sexe de la femelle et mis au point une lignée auto-sexable, de sorte que toutes les larves qui sont marquées sont des femelles. La détermination du sexe est donc devenue indispensable pour l'élevage du ver à soie parce que tous les sériciculteurs à l'heure actuelle n'élèvent que des hybrides pour exploiter l'hétérosis dans la production de cocons et dans ce but il est essentiel d'isoler précisément les mâles des femelles des lignées parentales pour une meilleure production d'œufs à coût réduit (Doira, 1978).

MISE AU POINT DE LIGNEES LIMITEES AU SEXE

Depuis la découverte du mécanisme déterminant le sexe par Tanaka (1916), de nombreux gènes responsables des traits morphologiques ont été cartographiés sur le chromosome Z, mais on n'a trouvé aucun gène d'importance morphologique sur le chromosome W. Cette découverte a non seulement montré la nature déterminante pour la femelle du chromosome W mais a aussi conduit à la découverte de souches limitées au sexe qui sont utiles sur le plan pratique. Chez la souche transloquée obtenue par Tazima (1941), les larves qui portent des marques sont invariablement femelles, tandis que toutes les larves qui ne sont pas marquées sont mâles, ce qui permet une séparation des sexes très facile au stade larvaire. Comme on ne trouve la manifestation des marquages larvaires que chez un sexe, de telles souches sont nommées souches limitées au sexe. Cependant, ces femelles qui portent le chromosome W ne sont pas assez robustes à cause de l'hyperploidie du fragment transloqué. Tazima (1954) a essayé de supprimer cette anomalie afin de les utiliser efficacement dans la production commerciale d'œufs. Après l'irradiation répétée de la souche transloquée, il a réussi à éliminer "le surplus" du deuxième chromosome transloqué, ne laissant ainsi qu'une petite fraction contenant le gène du marquage larvaire (+ P). Tazima et coll., (1951) ont induit la translocation entre le chromosome W et le 10^{ème} chromosome, ce dernier portant l'allèle dominant pour la couleur noire

de l'œuf qui est récessif par rapport à l'œuf blanc-2 (w2). Quand on accouple les femelles de la souche transloquée aux mâles à œufs blancs cela donne des œufs de couleur noire qui sont toujours femelles et des œufs blancs qui sont toujours mâles. Tazima a aussi mis au point, en co-opération avec un ingénieur M. Oshitani (Oshitani et coll., 1957), une machine de sexage automatique avec des tubes photoélectriques qui permet de séparer les œufs femelles avant l'éclosion. Après ces découvertes initiales, on a mis au point de nombreuses souches limitées au sexe avec des marquages larvaires (Hashimoto, 1948).

Kimura et coll., (1971) ont réussi à sélectionner une nouvelle souche dont les cocons jaunes sont femelles et dont les cocons blancs sont mâles. Cette équipe a transloqué le gène du sang jaune (y) du 2^{ème} chromosome sur le chromosome W par irradiation aux rayons X des nymphes femelles à 18 000 R par heure, durée d'irradiation 20 minutes et dose 6 000 R. Le gène y transloqué coexiste avec le gène de la couleur du cocon (c) sur le 12^{ème} chromosome, ce qui donne un sang jaune et des cocons jaunes. Ils ont nommé la nouvelle souche " ver à soie à cocon jaune limité au sexe ". Cette découverte est donc un résultat d'une grande importance. On a étudié les défauts physiologiques des femelles et la structure du chromosome transloqué dans la souche à cocon jaune limitée au sexe (Niino et coll., 1987). Les expériences de croisement de retour avec la souche à cocon jaune limitée au sexe montrent que les sites de l'œuf gris (Gr), du sang jaune (y) et de l'inhibiteur des gènes citron (*i-lem*) du 2^{ème} chromosome sont aussi transloqués sur le chromosome W.

Le raffinement de la sélection et des procédures de lignage ont amélioré la viabilité des femelles (Yamamoto, 1989). Ainsi, les lignées limitées au sexe sont devenues une réalité au Japon et elles ont ouvert un nouvel horizon grâce à l'application des principes fondamentaux de génétique pour un usage commercial en sériciculture.

PLACE DES LIGNEES LIMITEES AU SEXE DANS LA SERICICULTURE INDIENNE

En Inde, la plupart des variétés de vers à soie utilisées aujourd'hui par les fermiers à présent sont des femelles indigènes polyvoltines croisées avec des souches bivoltines (Nagaraju, 1996). Pour la production d'hybrides F1, on fournit des souches parentales aux fermiers pour élever " des cocons de grainage " et le gouvernement / les producteurs de graines agréés fournissent les cocons de grainage pour préparer les hybrides. La séparation des mâles et des femelles pour empêcher l'accouplement dans la même variété parentale est une tâche très importante dans la préparation d'œufs hybrides corrects. On procède à la séparation des mâles et des femelles en ayant recours au sexage au stade larvaire / nymphal. Une paire de petites taches est visible (les glandes d'Herald) sur le côté ventral de l'abdomen larvaire chez le mâle et quatre taches blanchâtres (glandes d'Ishiwata) chez les femelles mais seulement après la quatrième mue. Dans le cas des nymphes femelles, l'abdomen est large avec un marquage sur le 8^{ème} segment. Le mâle est petit de taille avec un abdomen étroit et une marque en forme de point sur le 8^{ème} segment, qu'il est difficile de distinguer à l'œil nu et il faut donc avoir recours à des personnes qualifiées pour s'assurer d'un degré élevé de précision. Cette méthode entraîne des erreurs et parfois blesse les nymphes. Au stade adulte, les larves ou les cocons femelles sont généralement plus lourds que les mâles. La séparation des sexes basée sur le poids du cocon entraîne aussi des erreurs et même 5 % d'intracroisements (accouplement entre papillons mâles et femelles de la même variété) et de grands problèmes dans la préparation des hybrides. La séparation des sexes au stade nymphal d'après les marques externes sur l'abdomen implique l'ouverture de chaque cocon, ce qui entraîne des pertes en cocons de grainage parce qu'ils ne sont pas directement utilisables pour le dévidage direct. Les lignées à la couleur du cocon limitée au sexe offrent donc un moyen simple et précis pour la séparation des sexes et la préparation correcte d'hybrides.

En Inde, l'ensemble de la soie grège est produite à partir d'hybrides de femelles polyvoltines et de lignées bivoltines (Datta et coll., 2001). Pendant la préparation des pontes F1 avec des souches

normales de vers à soie, on ne pratique pas le sexage au stade nymphal dans les centres de production d'œufs en Inde.

Quand on laisse de tels papillons émerger, on se débarrasse de presque 50 % des mâles polyvoltins (le ratio au sexe étant de 50 : 50). De même, 50 % des papillons femelles bivoltins sont écartés puisqu'on ne prépare pas de croisements réciproques à cause des raisons génétiques connues (Nakada, 1972 ; Murakami, 1989).

A présent, l'Inde a besoin de 330 millions d'hybrides polyvoltins × bivoltins par an (Mundukur et coll., 2002). Ce qui veut dire qu'on a besoin d'environ 1320 millions de cocons de grainage parents femelles (Pure Mysore). Sur cela, environ 660 millions de cocons de grainage (50 % étant mâles) sont gaspillés en laissant les mâles éclore. On estime le poids de ces cocons mâles à 660 Mt. La valeur de ces cocons de grainage serait d'environ 118,8 millions de roupies indiennes. Après l'émergence, le prix de vente des cocons percés permet d'obtenir environ 29,7 millions de roupies. Cela signifie donc une perte nette d'environ 89,1 millions de roupies. De même chez le parent bivoltin (bivoltin = un papillon mâle unique est utilisé deux fois dans les centres de production de grainage) 50 % des papillons femelles sont à nouveau gaspillés. La perte nette encourue est estimée à 88,4 millions de Rs. En utilisant des lignées limitées au sexe, on pourrait éviter une perte totale d'environ 177,5 millions de roupies (Tableau I).

Dans le cas des souches polyvoltines à marquage larvaire limité au sexe, les larves avec des marques sont invariablement femelles. Les mâles sont sans marque et peuvent être facilement rejetés au 3^{ème} âge. Dans le cas des souches bivoltines, les cocons femelles dont la couleur est limitée au sexe sont toujours de couleur jaune ; tandis que les mâles sont blancs. Ainsi, par une simple observation visuelle, on pourrait séparer les cocons mâles et femelles et les envoyer au dévidage avant l'émergence. On pourrait donc économiser beaucoup de main d'œuvre et d'argent en utilisant des souches limitées au sexe dans les centres de production d'œufs pour le commerce et au niveau des producteurs de cocons de grainage Pl. Malgré les avantages certains des souches limitées au sexe, elles n'ont pas été utilisées jusqu'à présent en Inde par manque de souches limitées au sexe adaptées ou parce qu'on croit que les femelles des souches limitées au sexe sont moins viables que les femelles normales. Les études systématiques réalisées par Nagaraju et coll., (1988) montrent que le sexe ratio et la viabilité des femelles chez les souches limitées au sexe ne diffèrent pas de ceux des souches normales. Cependant, les femelles des souches normales sont aussi légèrement moins viables que les mâles (Strunnikov, 1996). Yamamoto (1989) a aussi montré que par un lignage et des procédures de sélection systématiques, on peut obtenir le même taux de survie chez les femelles des lignées dont la couleur du cocon est limitée au sexe que chez les races ordinaires.

En Inde, Sengupta, (1968) a transféré les marquages larvaires limités au sexe de Sanish 18, une souche russe limitée au sexe, aux souches bivoltines J112 et C110. Compte tenu de cela, on a étudié les différences possibles de survie et de rendement des souches polyvoltines *C. Nichi*, HS6 et Pure Mysore avec des marquages limités au sexe qui sont utilisées en Inde (Iyengar et coll., 1975). Les études révèlent que les femelles sont légèrement moins viables et que l'effet nuisible de l'hyperploidie n'est pas sévère. Plus tard, des souches polyvoltines proches de la lignée Pure Mysore, avec des marquages larvaires limités au sexe, ont été mises au point (Sreeramareddy et Ananthanarayana, 1984 ; Nagaraju et coll., 1988). Les études systématiques réalisées sur la souche limitée au sexe Pure Mysore montrent qu'elle est meilleure que la lignée Pure Mysore normale comme lignée pure (Tableau II) ou comme hybride quand on la croise avec des souches bivoltines à rendement élevé (Nagaraju et coll., 1989). Mundukur et coll., (1999) ont mis au point une lignée polyvoltine SL-KSPM avec des marquages larvaires limités au sexe semblable à Pure Mysore et ont comparé sa performance de grainage à grande échelle avec celle de NB4D2 et ont observé que sa performance est similaire à la lignée Pure Mysore normale. Bhargava et coll., (1993) ont mis au point sept lignées à la couleur du cocon / de la larve limitées au sexe et rapporté qu'il n'y a pas de différence entre ces lignées et la lignée normale. Datta et coll., (1997) ont mis au point un hybride bivoltin robuste CSR18 × 19 avec des marquages larvaires limités au sexe et il a été autorisé à être exploité commercialement par le

Central Silk Board, du Gouvernement Indien. Ravindra Singh et coll., (2001) ont mis au point des lignées productives polyvoltines telles que MR1 (SL) et BL 27 (SL) à la couleur de cocon limitée au sexe. Datta et coll., (2001) ont mis au point une lignée bivoltine à la couleur du cocon limitée au sexe (CSR8) semblable à la lignée polyvoltine indienne NB4D2. Ces études indiquent qu'il n'y a pas de mortalité femelle chez la lignée limitée au sexe (Tableaux III & IV). Cette lignée passe un test d'autorisation au niveau national. Sudhakara Rao et coll., (2001) ont introduit la couleur du cocon limitée au sexe chez des lignées bivoltines productives c'est à dire CSR2, CSR5, CSR18, CSR19 et B72 en 1997. Les études de capacité de combinaison entre des lignées polyvoltines nouvellement mises au point comme BL23, BL24, BL67 et 96A et les lignées bivoltines ci-dessus, dont la couleur du cocon est limitée au sexe comme composant mâle, montrent des différences significatives pour des traits économiques importants par comparaison à PM × NB4D2. La performance des hybrides sélectionnés est présentée dans le Tableau V.

Ainsi les souches limitées au sexe ont pris une importance spéciale dans la sériciculture indienne et peuvent être utilisées comme composant mâle avec des femelles polyvoltines pour produire des hybrides F1 (Sudhakara Rao et coll., 2002) à un coût de production réduit et avec une préparation correcte.

GENETIC DIVERGENCE IN EXOTIC MULBERRY (*MORUS* SPP) GERMPLASM

A. TIKADER, A. ANANDA RAO & K. THANGAVELU

Central Sericultural Germplasm Resources Centre, Hosur, Tamil Nadu 635 109, India.

*One hundred and sixteen genotypes of exotic mulberry accession (*Morus* spp) were evaluated under tropical dry climate of Hosur during 1997 - 2000. Data on twelve important economic attributes were recorded to study the genetic divergence among these genotypes. Clustering of genotype was done on the basis of Ward's minimum variance dendrogram method. This study indicated that genetic divergence and geographic diversity were not related. Contribution of individual character towards genetic divergence showed that total shoot length and hundred leaf weight contributed the maximum towards total divergence. The genotypes with higher cluster mean of different characters could be used for mulberry breeding programme.*

Keywords : Mulberry, Variability, Divergence, Genotype.

INTRODUCTION

Mulberry (*Morus* spp) is an important foliage crop for rearing of the silkworm (*Bombyx mori* L.). Improvement through breeding is known to depend on the extent of magnitude of genetic diversity between genotypes. Based on the requirement, it is essential to identify genetically divergent genotypes among the exotic germplasm to select potential parents for breeding programme. Divergence analysis in mulberry is common and used for grouping the mulberry genotypes. Several authors reported its importance in grouping and suggested to utilize the representatives from different clusters in breeding (Rajan *et al.*, 1997, Fotedar and Dandin 1998, Vijayan *et al.*, 1999, Tikader *et al.*, 1999a, 1999b, Tikader *et al.*, 2001a, 2001b). The earlier authors have utilised mostly the indigenous mulberry genotypes or less number of genotypes or sometimes combination of exotic and indigenous genotypes. Thus, the present study was aimed to determine the extent of genetic divergence in 116 exotic mulberry genotypes and arrange the genotypes into homogenous groups for further utilisation in breeding programme to develop varieties with desirable parameters.

MATERIALS AND METHODS

The plant materials composed of 116 exotic genotypes collected from 20 countries i. e., Afghanistan, Australia, Bangladesh, Burma (Myanmar), China, Cyprus, Egypt, France, Hungary, Indonesia, Italy, Japan, Pakistan, Papua New Guinea, Paraguay, Philippines, Portugal, Russia, Thailand and Zimbabwe were used in the present study. The germplasm are being maintained at Central Sericultural Germplasm Resources Centre, Hosur 635 109, Tamil Nadu, India (12.45° N and 77.51° E, Altitude 942 m above mean sea level). The germplasm were maintained as dwarf tree, 4 plants / genotype and spacing 2.44 m × 2.44m. Cultural practices were followed as per standard package of practices recommended for mulberry cultivation (Roy *et al.*, 1973). The plants were pruned at 1.5 m crown height following two pruning per year for two years and data were recorded on twelve

growth traits. Leaf moisture % and moisture retention % in harvested leaves were calculated following the method reported earlier (Vijayan *et al.*, 1997). Other growth traits were recorded within 90 days after pruning as per set descriptor (Machii *et al.*, 1997; Tikader *et al.*, 2000). The genetic divergence among the genotypes was tested using Ward's criterion (1962). Ward's method was preferred as it is a popular default linkage which produce compact groups of well distributed size (Tikader and Rao 2001a). Before analysis of data, standardization of variables was under taken to enable the comparison of variables to minimize the bias in weighting, which may result from differing measurement scales and ranges. Significance of differences among genotypes was tested using the Wilk's criterion.

RESULTS AND DISCUSSION

The distribution of 116 exotic mulberry genotypes is presented in Table I and maximum number of genotypes are introduced from Japan (46) followed by Thailand (09), Zimbabwe (09), Pakistan (07) and China (06).

Table 1. Distribution of mulberry collected from different countries.

Tableau 1. Distribution de mûriers recueillis dans différents pays.

Sl. No.	Country	Code	Accession no.	
<i>No. de série</i>	<i>Pays</i>		<i>Nbre d'exemplaires</i>	<i>%</i>
1	Afghanistan	AFG	1	0.86
2	Australia / <i>Australie</i>	AST	1	0.86
3	Bangladesh	BGD	5	4.31
4	Burma (Myanmar)	BUR	5	4.31
5	China / <i>Chine</i>	CHI	6	5.17
6	Cyprus / <i>Chypre</i>	CYP	1	0.86
7	Egypt / <i>Egypte</i>	EGY	1	0.86
8	France	FRA	4	3.45
9	Hungary / <i>Hongrie</i>	HUN	1	0.86
10	Indonesia / <i>Indonésie</i>	IDA	4	3.45
11	Italy / <i>Italie</i>	ITA	5	4.31
12	Japan / <i>Japon</i>	JPN	46	39.66
13	Pakistan	PAK	7	6.03
14	Papua New Guinea	PAP	1	0.86
	<i>Papouasie Nouvelle Guinée</i>			
15	Paraguay	PAR	4	3.45
16	Philippines	PHI	1	0.86
17	Portugal	PRT	1	0.86
18	Russia / <i>Russie</i>	RUS	1	0.86
19	Thailand / <i>Thaïlande</i>	THI	4	3.45
20	Zimbabwe	ZIM	9	7.76
21	Unclassified / <i>Non classifié</i>		8	6.90
	TOTAL		116	100.00

The analysis of variance showed significant differences among the genotypes for all the traits indicating the existence of genetic variability in the materials used (Table II). Based on the relative value of the magnitude of divergence value the 116 genotypes were grouped into 14 clusters (Table III). Maximum number of genotypes were grouped in cluster VIII (15) followed by cluster III (12); cluster IX (10); cluster X (09); 8 genotypes in cluster I, IV, VII, XII and XIII; 7 genotypes each in cluster II and VI; 6 genotypes in cluster V and minimum 5 genotypes each in cluster XI and XIV. The grouping pattern indicated more or less uniform distribution of genotype in each cluster irrespective of different geographical origin. Similar result was also reported by Tikader *et al.* (1999) which confirms the present findings. But some authors reported the unequal distribution of indigenous and exotic genotypes in different clusters which is not in agreement with the present findings (Rajan *et al.*, 1997, Vijayan *et al.*, 1999, Tikader and Roy 2002). Cluster I and II represent the genotypes of five countries whereas cluster III, IV, VIII and cluster IX represent seven countries. Cluster VII and IX include five countries of varied climatic condition.

Table II. Variability in growth attributes in mulberry.

Tableau II. Variabilité des attributs de croissance chez le mûrier.

Characters	Mean $\pm$ SE			F-value
Caractères	Moyenne $\pm$ Ecart type	Min	Max	
No. of shoots / Nbre de pousses	14.00 $\pm$ 0.95	2.00	66.00	36.65**
Length of longest shoot (cm) Longueur de la pousse la plus longue (cm)	121.89 $\pm$ 3.68	23.67	235.00	8.00**
Internodal distance (cm) / Distance internodale (cm)	4.94 $\pm$ 0.10	2.51	7.01	8.45**
Total shoot length (cm) Longueur totale de pousses (cm)	1256.23 $\pm$ 103.42	42.33	6586.33	56.55**
100 Leaf weight (g) / Poids de 100 feuilles (g)	413.99 $\pm$ 19.69	78.48	1241.85	41.27**
Lamina weight (g) / Poids de la lame (g)	4.48 $\pm$ 0.19	0.72	11.00	38.09**
Leaf yield per plant Rendement en feuilles par plant	0.83 $\pm$ 0.05	0.07	2.38	13.62**
Moisture content (%) / Teneur en humidité (%)	69.41 $\pm$ 0.29	61.19	86.63	6.52**
Moisture retention (%) / Rétention d'humidité (%)	67.71 $\pm$ 0.83	26.80	88.56	10.89**
Leaf shoot ratio / Ratio feuille / pousse	2.11 $\pm$ 0.10	0.80	5.93	9.22**
Lamina index (%) / Indice laminaire (%)	88.83 $\pm$ 0.17	83.86	92.56	8.81**
Total biomass weight (kg) Poids total de la biomasse (kg)	1.40 $\pm$ 0.10	0.113	4.70	14.18**

Table III. Cluster composition based on divergence analysis in mulberry.

Tableau III. Composition des groupes d'après l'analyse de divergence chez le mûrier.

Clusters	No. of acc.	Accession with country code.
Groupes	Nbre d'exemplaires	Exemplaire avec code du pays
I	8	<i>M. Australia</i> (Ast), Fukushima-OHA (Jpn), Okinawa (Jpn), Burma-8 (Bur), <i>M. alba</i> Rangoon (Bur), Pks-1-2 (Pak), Cyprus (Cyp), PKSII-12 (Pak).
II	7	<i>M. nigra</i> (Ida), Japan-II (Jpn), Lloyos (Jpn), Pks 1-4, (Pak) Bogurai-1 (Bgd), <i>M. macroura</i> (Jpn), <i>M. rotundiloba</i> (Bur).
III	12	Pks 1-14 (Pak), Thailand lobed (Thi), Limoncina (Ita), Pks-248 (Pak), Pks 1-9 (Pak), Kokuso-13 (Jpn), China black-B (Chi), China black (Chi), French-1 (Fra), Shin ichinose (Jpn), French (Fra), Miuraso (Par).
IV	8	Pks 1-11 (Pak), Canton china (Chi), Calabresa (Par), Lisbon (Prt), <i>M. cathayana</i> (Ida), Thai pecah (Thi), Katania (Jpn), China white (Chi).
V	6	Acc.152 (Jpn), Acc.332 (Unid), Acc.135 (Unid), Kanzan (Jpn), Sidseguwa (Jpn), Ichihei (Jpn).
VI	7	Shrim-8 (Bgd), Hungarian (Hun), Shrim-5 (Bgd), Thailand male (Thi), Acc.107 (Unid), Shrim-2 (Bgd), S1 (Bur).
VII	8	Papua New Guinea (Pap), Fernodias (Par), Atsubamidori (Jpn), Acc.165 (Unid), Bogura -4 (Bgd), Seizuro (Jpn), Thai beelad (Thi), Acc.116 (Unid).
VIII	15	Moulai (Bur), Mizusawa (Jpn), <i>M. multicaulis</i> (Ida), Zimbabwe-6 (Zim), English black (Fra), Zimbabwe-8 (Zim), Lazuraso (Jpn), Japanese (Jpn), Moretiana (Ita), China peaking (Chi), Zimbabwe-3 (Zim), Acc.148 (Unid), Tsukasaguwa (Jpn), Zimbabwe-4 (Zim), Zimbabwe-7 (Zim).
IX	10	Philippines (Phi), Kamiso-402 (Jpn), Goshocrami (Jpn), Acc.56 (Egy), <i>M. lhou</i> seringe (Fra), Cattanco (Ita), Zimbabwe-11 (Zim), Moreti (seringe) (Jpn), Zimbabwe-5 (Zim), Australia (Ast).
X	9	Paraguay (Par), Kokuso-21 (Jpn), Xuan-10 (Chi), Kabul (Afg), Zimbabwe-1 (Zim), Fusimata (Jpn), Rohachi (Jpn), Kanmasari (Jpn), Oshima (Jpn).
XI	5	Kairyo roso (Jpn), Italian mulberry (Ita), Kokuso-27 (Jpn), Sosuke-1 (Jpn), Kokuso-20 (Jpn).
XII	8	Wasemidori (Jpn), Tusimakawa (Jpn), Japan-Japan (Jpn), Kng (Jpn), Kokuso (Jpn), Akagi (Jpn), Ensatakasuke (Jpn), sterile (Jpn).
XIII	8	Kenmochi (Jpn), Acc.134 (Unid), Kosen (Jpn), Sukakuchi (Jpn), Shimanouchi (Jpn), Roso (Jpn), Aoroso (Jpn) Sannish-5 (Rus).
XIV	5	Italian semal (Ita), Rokokuyaso (Jpn), <i>M. serrata</i> (Unid), Zimbabwe-2 (Zim), Obowase (Jpn).
	116	

Table IV. Average Inter and Intra cluster distances in mulberry germplasm.**Tableau IV. Distances inter et intra groupes moyennes chez les germoplasmes de mûriers.**

Cluster	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
I	2.36	3.65	3.00	4.40	3.97	6.72	6.22	5.14	6.11	4.92	6.00	4.65	4.50	3.82
II		3.51	3.85	4.02	4.22	5.73	5.11	5.35	6.98	6.40	7.07	5.88	5.33	4.98
III			1.94	3.25	2.94	6.16	5.20	3.96	5.18	4.29	5.48	3.97	3.27	2.70
IV				2.31	3.13	4.33	3.35	3.39	5.60	5.65	6.63	5.71	4.48	4.33
V					2.59	5.29	4.28	3.41	4.71	4.35	5.62	4.38	3.18	3.04
VI						2.65	3.32	5.48	7.68	8.03	9.04	8.20	7.18	7.03
VII							2.34	4.43	6.81	7.24	8.09	7.23	5.93	6.02
VIII								2.89	4.12	4.73	5.92	5.55	3.93	4.05
IX									3.06	3.91	5.44	5.42	3.94	4.06
X										2.64	4.47	3.98	3.18	3.21
XI											4.36	5.04	4.15	4.76
XII												3.65	3.35	3.03
XIII													1.90	2.21
XIV														1.56

Maximum and minimum intra cluster distance is 4.36 and 1.56, respectively / *La distance intra groupe maximum et minimum est respectivement de 4,36 et 1,56.*

Maximum and minimum inter cluster distance is 9.04 and 2.21, respectively / *La distance inter groupes maximum et minimum est respectivement de 9,04 et 2,21.*

Cluster V grouped genotypes from Japan (4) and unidentified (2) source. Cluster VI represents four countries and one unidentified source. In cluster XI, 5 genotypes are grouped from Japan and Italy. Total 8 genotype each are grouped in cluster XII and XIII. In cluster XIV, the genotypes grouped from three different countries including one genotype from unknown source. Though the genotypes were originated from geographically different countries, grouped in separate cluster, but there is a close affinity among themselves to group in same or nearer cluster.

The mulberry germplasm from Japan (46) distributed in all the clusters except in cluster VI. The result indicates that the countrywise collections tends to group together in the same or nearer cluster irrespective of its origin either from similar agro-climatic zone or different zones (Table III). Seven genotypes from Pakistan distributed in Cluster I, II, III and IV. The similar trends were also observed in case of other genotypes collected from other countries.

The average intra - cluster distance varied from 1.56 (cluster XIV and XI) to 4.35 (Table IV). The maximum inter-cluster distance (9.04) was observed between cluster VI and XI indicating high genetic divergence genotypes of these two groups. Minimum inter-cluster distance (2.21) was observed between cluster XIII and XIV showing their close affinity. However, in all cases the inter-cluster distances were greater than the intra-cluster distances indicating the genetic diversity present among the genotypes between different clusters.

Cluster mean indicates substantial variations among the 14 clusters (Table V). Seven mulberry genotypes were grouped in cluster VI from Bangladesh, Burma (Myanmar), Hungary, Thailand and

other sources having the higher values of number of shoots (26.78 cm), longest shoot length (184.73 cm), total shoot length (3238.90 cm), leaf yield per plant (1.65 kg) and total biomass weight per plant (3.68 kg). Internodal distance (5.96 cm), lamina weight (8.18 g) and 100 leaf weight (773.84 g) were higher in cluster IX which represents 10 genotypes from seven countries. Laminar index (91.39 %) and moisture content (72.05 %) were higher in cluster X and XIV. Moisture retention (74.44 %) and leaf shoot ratio (4.77) were high in cluster XI. Thus, it can be seen that the genotypes in different cluster showed superiority in different characters. So, the genotype with higher cluster mean of different characters could be used judiciously for crop improvement programme.

Table V. Cluster wise mean of different growths in mulberry germplasm.

Tableau V. Moyenne des différentes croissances en fonction du groupe chez les mûriers.

Cluster	NSHOOT	LLS	INT -DIST	WT- -LAM	TSL	TMC	MRC	HUN -WT	LYP	LSR	LAM -IND	TBIO
<i>Groupe</i>												
I	9.07	96.39	4.28	2.06	713.39	65.54	52.29	184.22	0.32	1.43	89.74	0.80
II	17.51	124.64	4.52	2.11	1467.92	65.91	49.04	187.58	0.63	1.43	87.13	1.36
III	9.91	108.66	4.47	2.50	749.62	68.34	67.38	217.96	0.41	1.63	88.19	0.96
IV	14.88	157.63	5.33	3.26	1588.56	68.05	68.85	295.53	0.92	1.22	87.52	2.10
V	11.61	131.44	4.41	4.16	1074.63	70.60	64.29	395.30	0.91	2.19	88.59	1.46
VI	26.78	184.73	5.56	3.36	3238.97	69.37	62.47	309.45	1.65	1.16	89.65	3.68
VII	20.75	170.90	5.36	4.17	2368.32	70.28	65.43	363.27	1.59	1.44	86.40	3.47
VIII	9.65	141.49	5.85	5.77	985.26	69.25	72.91	549.24	0.91	1.64	88.65	2.01
IX	5.35	102.26	5.96	8.18	430.39	71.82	73.85	773.84	0.39	2.36	90.55	0.80
X	3.37	71.00	3.73	6.15	191.65	69.48	73.14	618.85	0.30	2.37	91.39	0.57
XI	3.62	68.91	3.97	6.32	204.82	64.21	74.44	617.74	0.31	4.77	89.23	0.28
XII	4.54	63.53	3.31	3.72	233.81	71.40	67.36	307.28	0.24	3.38	89.20	0.47
XIII	6.40	95.56	4.04	5.53	453.11	70.45	71.19	500.53	0.46	3.24	88.03	0.67
XIV	6.44	90.09	4.46	4.20	439.27	72.05	67.72	342.84	0.27	2.74	89.18	0.53

The contribution of different characters towards total divergence was 78.64% in total shoot length followed by 100 leaf weight (21.24 %). Very less or no contribution was recorded for other traits towards divergence. So, based on performance, the characters contributing maximum could be considered for identifying divergent mulberry genotypes.

The results of the present study clearly indicates that the mulberry distributed over wide range of geographical conditions grouped with each other provides sufficient scope to broaden the genetic base and select the potential parents for utilizing in crop improvement programme.

REFERENCES

- FOTEDAR R. K., DANDIN S. B. (1998) Genetic divergence in mulberry. *Sericologia*, 38 (1) : 115 - 125.
- MACHII H., KOYAKAMA A., YAMANOUCHI H., KATAGIRI K. (1997) Manual for the characterisation and evaluation of mulberry genetic resources. Misc. Publ. Natl. Inst. Seric. Entomol. Sci. 22 : 105 - 124.
- RAJAN MALA V., CHATURVEDI H. K., SARKAR A. (1997) Multivariate analysis as an aid to genotypic selection for breeding in mulberry. *Indian Journal of Sericulture*, 36 (2) : 111-115.
- ROY D., MONDAL L. N., PAIN A. K., MONDAL S. K. (1973) Effect of NPK and farm yard manure on the leaf yield and nutritive value of mulberry leaf. *Indian Journal of Sericulture*, 12 : 7 - 12.
- TIKADER A., RAO A. A., RAVINDRAN S., NAIK V. G., MUKHERJEE P., THANGAVELU K. (1999 a) Divergence analysis in different mulberry species. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, 59 (1) : 87 - 93.
- TIKADER A., RAO A. A., MUKHERJEE P. (1999b) Evaluation of mulberry germplasm for selection of parents. In *Proceedings of National Seminar on Tropical Sericulture*, University of Agricultural Sciences, GKVK, Bangalore 560 065, pp. 6 - 9.
- TIKADER A., RAO A. A., MUKHERJEE P. (2000) Phenotypic Characterisation of Mulberry (*Morus* spp) Germplasm. In *Proceedings of the 4th China International Silk Conference*, China, pp. 114 - 125.
- TIKADER A., RAO A. A. (2001 a) Analysis of divergence in mulberry species through different clustering techniques. *Sericologia*, 41 (1) : 109 - 116.
- TIKADER A., ROY B. N. (2001 b) Genetic divergence analysis in mulberry germplasm (*Morus* spp.). *Indian Journal of Forestry*, 24 (3) :
- TIKADER A., ROY, B. N. (2002) Genetic divergence in mulberry (*Morus* spp.). *Indian J. Genetics and Plant Breeding*, 62 (1) : 52 - 54.
- VIJAYAN K., TIKADER A., DAS K. K., CHAKROBORTI S. P., ROY B. N. (1997) Correlation studies in mulberry (*Morus* spp). *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, 57 (4) : 455 -60.
- VIJAYAN K., DAS K. K., DOSS S. G., CHAKROBORTI S. P., ROY B. N. (1999) Genetic divergence in indigenous mulberry (*Morus* spp) genotypes. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 69 (12) : 851 - 853.
- WARD J. H. (1963) Hierarchical grouping to optimise an objective function. *Journal of American Statistical Association*, 58 : 236 - 244.

DIVERGENCE GENETIQUE CHEZ DES GERMOPLASMES DE MURIERS EXOTIQUES (*MORUS* SPP)

A. TIKADER, A. ANANDA RAO & K. THANGAVELU

Central Sericultural Germplasm Resources Centre, Hosur, Tamil Nadu 635 109, Inde.

*Nous avons évalué cent seize génotypes d'exemplaires de mûriers exotiques (*Morus* spp.) sous le climat tropical sec de Hosur de 1997 à 2000. Nous avons enregistré les données pour douze caractères économiques importants afin d'étudier la divergence génétique entre ces génotypes. On procède au regroupement des génotypes sur la base de la méthode du dendogramme de variance minimum de Ward. Cette étude montre que la divergence génétique et la diversité géographique ne sont pas liées. La contribution du caractère individuel envers la divergence génétique montre que la longueur totale de la pousse et le poids de cent feuilles contribuent au maximum de la divergence totale. Les génotypes ayant la moyenne la plus élevée du groupe pour les différents caractères pourraient être utilisés dans des programmes de lignage du mûrier.*

INTRODUCTION

Le mûrier (*Morus* spp) est une culture à feuillage importante pour l'élevage du ver à soie (*Bombyx mori* L.). On sait que l'amélioration par le lignage dépend de l'amplitude de la diversité génétique entre les génotypes. Il est essentiel d'identifier, en fonction des besoins, des génotypes génétiquement divergents parmi les germoplasmes pour sélectionner des parents potentiels dans les programmes de lignage. L'analyse de la divergence chez le mûrier est courante et utilisée pour le regroupement des génotypes de mûrier. Plusieurs auteurs ont rapporté son importance pour le regroupement et suggéré d'utiliser les représentants de différents groupes pour le lignage (Rajan et coll., 1997, Fotadar et Dandin 1998, Vijayan et coll., 1999, Tikader et coll., 1999a, 1999b, Tikader et coll., 2001a, 2001b). Avant eux, les auteurs ont principalement utilisé les génotypes de mûrier exotiques ou un nombre inférieur de génotypes ou parfois une combinaison de génotypes exotiques et indigènes. Cette étude est donc destinée à déterminer le degré de divergence génétique entre 116 génotypes de mûriers exotiques et à classer les génotypes dans des groupes homogènes pour une utilisation ultérieure dans un programme de lignage afin de mettre au point des variétés aux paramètres désirables.

MATERIELS ET METHODES

Dans cette étude on utilise les matériels végétaux composés de 116 génotypes exotiques recueillis dans 20 pays, c'est à dire l'Afghanistan, l'Australie, le Bangladesh, le Burma (Myanmar), la Chine, Chypre, l'Egypte, la France, la Hongrie, l'Indonésie, l'Italie, le Japon, le Pakistan, la Papouasie Nouvelle Guinée, le Paraguay, les Philippines, le Portugal, la Russie, la Thaïlande et le Zimbabwe. Les germoplasmes sont maintenus au *Central Sericultural Germplasm Resources Centre*, à Hosur 635 109, dans le Tamil Nadu en Inde (12,45° N et 77,51° E, à une altitude de 942 m au-dessus du niveau de la mer). Les germoplasmes sont maintenus sous la forme d'arbres nains, avec 4 plants / génotype et un espacement de 2,44 m × 2,44m. On suit les pratiques culturales habituelles recommandées pour la culture du mûrier (Roy et coll., 1973). La cime des plants est taillée à une hauteur de 1,5 m en procédant à deux tailles par an pendant deux ans et on enregistre les données

pour 12 caractères de croissance. On calcule le % d'humidité de la feuille et le % de rétention de l'humidité dans les feuilles recueillies en suivant une méthode décrite antérieurement (Vijayan et coll., 1997). On enregistre les autres caractères 90 jours après la taille d'après un descripteur fixe (Machii et coll., 1997 ; Tikader et coll., 2000). On teste la divergence génétique entre les génotypes en utilisant les critères de Ward (1962). On préfère la méthode de Ward car c'est une liaison populaire par défaut qui donne des groupes compacts d'une taille bien répartie (Tikader et Rao 2001a). Avant l'analyse des données, on procède à la standardisation des variables pour minimiser la distorsion due au poids, qui pourrait venir d'échelles et de modes de mesure différentes. On teste la signification des différences entre les génotypes en utilisant les critères de Wilk.

RESULTATS ET DISCUSSION

La distribution des 116 génotypes de mûrier exotiques est présentée dans le Tableau I qui montre qu'un nombre maximum de génotypes a été introduit du Japon (46) suivi par la Thaïlande (09), le Zimbabwe (09), le Pakistan (07) et la Chine (06).

L'analyse de variance montre des différences significatives parmi les génotypes pour tous les caractères, ce qui indique l'existence d'une variabilité génétique dans les matériels utilisés (Tableau II). On regroupe les 116 génotypes dans 14 groupes d'après la valeur relative de l'amplitude pour la valeur de la divergence (Tableau III). Il y a un nombre maximum de génotypes dans le groupe VIII (15), suivi par le groupe III (12) ; le groupe IX (10) ; le groupe X (09) ; 8 génotypes dans les groupes I, IV, VII, XII et XIII ; 7 génotypes dans les groupes II et VI ; 6 génotypes dans le groupe V et un minimum de 5 génotypes dans les groupes XI et XIV. Le schéma de regroupement montre une distribution plus ou moins uniforme des génotypes dans chaque groupe indépendamment de leur origine géographique. Tikader et coll., (1999) ont rapporté des résultats similaires qui confirment nos observations (Rajan et coll., 1997, Vijayan et coll., 1999, Tikader et Roy, 2002). Les groupes I et II représentent les génotypes de cinq pays tandis que les groupes III, IV, VIII et le groupe IX représentent sept pays. Les groupes VII et IX incluent cinq pays de conditions climatiques variées.

Le groupe V regroupe des génotypes du Japon (4) et de sources non identifiées (2). Le groupe VI représente quatre pays et une source non identifiée. Le groupe XI regroupe 5 génotypes du Japon et d'Italie. Les groupes XII et XIII regroupent un total de 8 génotypes. Dans le groupe XIV, les génotypes regroupés viennent de trois pays différents y compris un génotype d'une source inconnue. Bien que les génotypes proviennent de pays géographiquement différents et soient regroupés dans des groupes séparés, il y a une affinité proche entre eux qui permettrait de les regrouper dans le même groupe ou dans un groupe proche.

Les germoplasmes de mûrier du Japon (46) sont distribués dans tous les groupes sauf dans le groupe VI. Les résultats indiquent que les collections provenant d'un pays tendent à être rassemblées dans le même groupe ou dans un groupe proche qu'ils proviennent d'une zone agro-climatique similaire ou de zones différentes (Tableau III). Sept génotypes du Pakistan sont distribués dans les groupes I, II, III et IV. On observe des tendances similaires pour d'autres génotypes recueillis dans d'autres pays.

La distance moyenne intra-groupe varie de 1,56 (groupes XIV et XI) à 4,35 (Tableau IV). On observe la distance inter-groupes maximum (9,04) entre le groupe VI et XI, ce qui indique qu'il y a des génotypes à la divergence génétique élevée dans ces deux groupes. On observe la distance inter-groupe minimum (2,21) entre le groupe XIII et XIV, ce qui montre une affinité proche. Cependant, dans tous les cas les distances inter-groupe sont plus grandes que les distances intra-groupes, ce qui indique qu'il y a une diversité génétique entre les génotypes des différents groupes.

La moyenne par groupe indique des variations importantes entre les 14 groupes (Tableau V). Sept génotypes de mûrier du Bangladesh, de Burma (Myanmar), de Hongrie, de Thaïlande et d'autres sources sont regroupés dans le groupe VI ; ils présentent les valeurs les plus élevées pour le nombre

de pousses (26,78 cm), la longueur de pousse la plus grande (184,73 cm), la longueur de pousse totale (3238,90 cm), le rendement foliaire par plant (1,65 kg) et le poids total de la biomasse par plante (3,68 kg). La distance internodale (5,96 cm), le poids de la lame (8,18 g) et le poids de 100 feuilles (773,84 g) sont plus élevés dans le groupe IX qui représente 10 génotypes de sept pays. L'indice laminaire (91,39 %) et la teneur en humidité (72,05 %) sont plus élevés dans les groupes X et XIV. La rétention d'humidité (74,44 %) et le rapport feuille / pousse (4,77) sont élevés dans le groupe XI. On peut donc voir que les génotypes des différents groupes présentent une supériorité pour différents caractères. On pourrait donc judicieusement utiliser le génotype avec la moyenne de groupe la plus élevée pour différents caractères dans des programmes d'amélioration des plantes.

La contribution de différents caractères envers la divergence génétique totale est de 78,64 % pour la longueur totale de la pousse suivie par le poids de 100 feuilles (21,24 %). On enregistre une contribution très faible ou absente des autres traits envers la divergence. On pourrait donc d'après la performance, considérer les caractères dont la contribution est maximum pour identifier les génotypes de mûrier divergents.

Les résultats de cette étude indiquent clairement que les mûriers distribués provenant de conditions géographiques très variées se regroupent ensemble, ce qui fournit des possibilités suffisantes pour élargir la base génétique et sélectionner des parents potentiels dans les programmes d'amélioration des cultures.

STUDIES ON THE FACTORS, CONTROLLING THE PACE OF DEVELOPMENT OF THE TISSUES, HAMPERING THE REGENERATION OF *TERMINALIA ARJUNA* (BEDD) THROUGH CUTTINGS

P. S. SINHA, S.BECK, M. C. JOSHI, A. GANGOPADHAYAY, A. K. SINHA & B. R. R.P. SINHA

Central Tasar Research and Training Institute, Piska Nagri, Ranchi, Jharkhand, India Pin-835303.

Terminalia arjuna (Bedd.) is a primary food plant of tropical tasar silkworm *Antheraea mylitta* D. It is a hard to root plant species and experiments conducted so far to regenerate it through cuttings could not yield much and mostly failed. Recently studies made at **Central Tasar Research and Training Institute**, Nagri, Ranchi, revealed that the presence of hard tissues in the form of collenchymatous and sclerenchymatous rings serves as mechanical barrier to emergence of roots from stem cuttings of *T. arjuna*. Breaking of these mechanical barrier or selection of such material having little or no mechanical barrier improved the rooting to a considerable extent. Collenchymatous and sclerenchymatous tissues are mainly meant to give mechanical support to plant and develop gradually. Since these tissues develop gradually with the growth and development of plant, these tissues are also likely to be influenced by various external factors. The present study brings out the role of various environmental factors in the development of these hard tissues and its relation with the rooting and suggests a protocol for producing plant material with little or no mechanical barrier for ensuring easy propagation of *T. arjuna* through cuttings. It is stressed upon that propagation of *T. arjuna* through cuttings has far reaching implications in tasar culture such as development of improved varieties, which could not be done so far in absence of this propagation tool, bringing down the too long gestation period, besides having uniform population of food plants for more uniform rearing.

Keywords: Collenchymatous and sclerenchymatous layers, mechanical barrier, rooting percent, rooting time, environmental factors.

INTRODUCTION

Terminalia arjuna is a primary food plant of tropical tasar silkworm *Antheraea mylitta*. It is one of the most difficult to root plant species and experimentations conducted so far including those carried out for about last forty years at *Central Tasar Research and Training Institute* Ranchi, the institution dedicated exclusively for Research and Development of tropical tasar, could not yield much and mostly failed (Sinha *et al.*, 2000). Rooting is associated with genetic, anatomical physiological and biochemical factors or a combination of two or more of them. Sinha *et.al* (1999, 2000) have reported that in *T. arjuna* collenchymatous and sclerenchymatous rings serves as mechanical barrier to rooting and breaking these hard layers/barrier or selecting such material having ill developed or underdeveloped mechanical barrier has considerably improved the rooting, even up to 86.6% in some cases. Ciampi and Gellini (1963) also ascribed the poor rooting of *Olea europaea* L. to presence of sclerenchyma cells which act as a mechanical barrier. Development of plants is influenced by a variety of external factors and some of these are likely to influence the development of these mechanical tissues too. In general also many internal factors like age of the stock plant, nutritional and hormonal conditions of the plant, maturity of tissues, light temperature water etc. are reported to influence

rooting (Bose *et.al.* 1991). Hartmann and Kester (1986) have also opined that type of cutting, growth hormones, the time of the year when cuttings are taken, age of the mother plant and several other factors play a significant role in induction of roots from the cuttings. The present study was carried out with a view to work out the effect of the various external factors on the development of these hard tissues/ layers and to find out its relationship with rootability so that the material with little or no mechanical barrier may be produced to ensure easy and faster propagation of *T. arjuna* through cuttings. This will help in formulating a complete protocol of vegetative propagation of *T. arjuna*, through cuttings.

MATERIALS AND METHODS

The study was carried out at Arboriculture Division of Central Tasar Research and Training Institute, Nagri, Ranchi, India.

The factors considered for the study were:

- NPK fortification to the mother plant.
- Light intensity, under which the mother plant is growing.
- Pruning of the mother plant.
- Form of the mother plant.
- Age of the mother plant.
- Hygrothermic conditions of the surroundings where mother plant is growing.

The material selected for the study was leaf node cuttings of *T. arjuna* having 3rd to 4th node and one pair of leaves taken from the contemporary branches of approx. 2 months age. These leaf node cuttings were put to anatomical study. Anatomical studies were performed on the cross sections of these cuttings under microscope by measuring the thickness of collenchymatous and sclerenchymatous layers, using stage micrometer. Thickness of these layers were taken as indicator of pace of development of these tissues as the age of the branch was same. Rootability study was carried out by putting the cuttings in polythene bags of 30 × 10 cm, filled with sterile sand, kept in subsoil pit of 2m × 1m × 1m size, covered with transparent polythene sheets. The cuttings and the walls of pits were sprayed with water two to three times a day to maintain humidity level around 80-85 %. Regular observations were made on root initiation. The treatments for different factors were provided as under.

NPK fortification:

The plot of existing plantation of *T.arjuna* having uniform population was divided into two parts. One part was provided with the recommended NPK dose @ 100:50:50 kg/Ha/Yr (N1, control) and another half was not fortified with any fertilizer (N2.) Each treatment was replicated 10 times.

Light intensity:

Two treatments were performed :

- L1. Plants growing in open having normal solar illumination (control).
- L2. Plants growing in shady patches of the same plantation.

Pruning:

Under this factor there were four treatments as under.

- H1. Pruned at the height of 45cm
 - H2. Pruned at the height of 90 cm.
 - H3. Pruned at the height of 180 cm
 - H4. Light clipping (control)
- Each treatment was replicated five times.

Form of the mother plant:

This consists of two treatments as under:

F1: Plants were allowed to grow freely, without any pruning treatment (control)

F2: Plants of the same lot were kept in bushy form by repeated pruning at 30 cm height.

Each treatment was replicated 10 times.

Moisture conditions of the surroundings:

Under this treatment also there were two treatments as under :-

T1: Plant kept in hygrothermic simulators at around 75-80% most of the time

T2: Plants kept in hygrothermic simulators at around 40 to 50% RH (control).

Each treatment was replicated 10 times. There were 24 cuttings in each replicate. Cuttings were put to anatomical and rootability studies as mentioned above

RESULTS AND DISCUSSIONS

The data on anatomical studies i.e. thickness of collenchymatous/ sclerenchymatous layers and rootability of cuttings under different treatments are presented in Table I and fig. 1 and 2.

NPK fortification:

Perusal of Table I and fig. 1 shows that non application of NPK has considerably reduced the thickness of these mechanical layers, by about 59.09% over their NPK fortified counterparts. The sets without NPK have showed a considerable improvement in rooting by about 184.69%. The rooting time also came down by about 25.3% in these sets compared to NPK applied counterparts. These findings suggest that NPK application enhances the development of mechanical tissues probably as part of normal growth process. Nutrient deficiency has been reported to cause considerable reduction in thickness of the palisade zone in mulberry (Shaker *et.al.* 1997). Withdrawing the supply of 'N' could have also disturbed the C: N ratio as high C: N ratio is known to produce more roots (Kraus and Kraybill, 1918). Pears (1943, 1946) reported that reducing nitrogen in stock plant improved root formation by cutting.

Light intensity:

As evident from Table I and fig. 1, light intensity has a direct bearing on the development of mechanical tissues as thickness of these layers came down by 77.94% when the plants were grown under shade, over their counterparts growing under sun. Reduction in thickness of these layers has reflected in considerable improvement in the rooting, by 186.53%, with reduction in rooting time by 31.09%. Nanda and Kocher (1985) had observed the reduction in the amount of mechanical tissues decreased thickness of cell wall deposits and also the amount of vascular tissues by etiolation. Frolich (1961), Delogy and Wright (1979), Johnson and Hamilton (1977) and Singh (1968) have also reported the induction of the root formation by etiolation. Biran and Halevy (1973) found that low light intensity of stock plants gives better rooting. The observations of Hansen and Erikson (1974) were almost similar.

Pruning:

Cutting the main trunk or the portion of branches is called pruning. Pruning breaks the apical dominance and sends good amount of lateral branches /shoots. As evident from the data, the height of the pruning also influences the development of mechanical tissues. The drastic pruning at 15 cm height has minimum amount of mechanical tissues. The increasing height of pruning increases the thickness of the layers of mechanical tissues, e.g. reduction of 56.75% was recorded at 45 cm against 29.72% at 90 cm. It is also evident from Table I, that decrease in thickness of mechanical tissues is duly reflected on the rooting e.g. an improvement of 293.4% and 128.57% was noticed at 45 and 90 cm respectively over control. It appears that drastic pruning makes the plant regain its height at a faster

pace and thickening part comes later on. Libby *et al.*, (1972) also observed that rooting potential of the cuttings was maintained by hedging. Wellensick (1952) also noticed that mother plant forced to remain in juvenile form by debudding or cutting back gives better rooting.

Form of mother plant:

Perusal of table I and fig 1 makes it clear that maintaining the plants in bush form by repeated drastic pruning at 30 cm height keeps the pace of development of mechanical tissue very low and plant in juvenile form. Data show that maintaining the plant in bush form suppresses the development of collenchymatous and sclerenchymatous layers by 83.3%. This resulted in 52.18% rooting against 1.25% rooting in tree counterparts i.e. an improvement of 422.8%, in just 30.6 days compared to 43 days of normal trees. Thus, maintaining the plant in bush form is a good way of getting softer material with lesser mechanical tissues. This is attributed to the fact that small bushes need less mechanical strength compared to trees and accordingly the pace of development of these tissues in tree is much higher than bushes. Libby *et al.*, (1972) observed that rooting potential of cuttings was maintained by hedging. Wellensick (1962) also noticed that mother plant forced to remain in juvenile form by debudding or cutting back gives better rooting.

Age of mother plant:

As can be seen from the data the age of mother plant has a direct bearing on the pace of development of mechanical tissues as the thickness of mechanical tissues has increased with the age of mother plant from 2 to months to 2 years. Plants of 2, 3, 6 and 12 months of age had 96, 86, 72.03, 32.03% less mechanical barrier compared to 24 months old control and same is fully reflected in rooting e.g. it recorded an enhancement of 69.31, 47.8, 34.7 and 17.3% respectively. Rooting time increased with the increasing age of mother plant. Reduction in rootability with age of the plant in Som was observed by Rajaram and Samson, (1995), however, they have not spelt out the specific reason for it.

Hygrothermal conditions of the surrounding:

As evident from table I and fig. 1, keeping the plant in moist surrounding (R. H. ranging 80-90%) reduced the development of mechanical tissues (by about 47.2%). These findings go with Ali *et al.*, (1999) who found that secondary thickening as well as the number of sclerenchymatous cells of bundle sheath became maximum in water logged situation and moderate in natural and saturated soil moisture conditions. Good moisture condition improved the rooting by about 33.03%.

Quantitative relationship between reduction of mechanical barrier and rootability:

The efficacy of rootability improvement per unit reduction in mechanical barrier is shown in fig. 2. It can be seen clearly that reduction in the amount of mechanical tissues is always not proportionate to improvement in rooting. The percent improvement in rooting for unit reduction in thickness of mechanical barrier varies considerably with different factors. Efficacy was maximum in reduction in height by pruning either by drastic or repeated pruning, followed by NPK withdrawal and shading etc. This indicates that induction of rooting by different factors is not merely a mechanical phenomenon but is a chemo-mechanical process. The reduction in the amount of mechanical tissues may be accompanied with favourable changes in physiological and biochemical status but to varying extent. This is the reason why the reduction in the amount of mechanical tissues is always not proportionate to improvement in rooting. Drastic pruning appears to be most efficient followed by withholding the supply of NPK.

The foregoing discussion clearly indicate that the material with little mechanical barrier, can well be obtained by altering the external factors. Rootability is strongly related to development of these mechanical barrier, hence suitable stem cutting, to get good regeneration can be obtained by following:

Table I. Thickness of collenchymatous and sclerenchymatous layers (MB) and rootability as influenced by external factors, under which mother plants are exposed.

Tableau I. Epaisseur des couches collenchymateuses et sclérenchymateuses (MB) et racinement sous l'influence de facteurs externes auxquels les plantes mères sont exposées.

Factors	Status / Treatment	Thickness of MB (mm)	Rootability		Improvement / reduction by factor manipulation / over control			CD at 5% level / t value		
			(%)	Time (days)	Thickness of MB	Rooting percent	Rooting time	Thickness of MB	Rooting (%)	Rooting time
<i>Facteurs</i>		<i>Epaisseur des MB</i>	<i>Racinement</i>		<i>Amélioration / diminution par la manipulation des facteurs par rapport au témoin</i>			<i>DC au seuil de 5 % / valeur t</i>		
	<i>Statut / Traitement</i>	<i>(mm)</i>	<i>(%)</i>	<i>Durée (jours)</i>	<i>Epaisseur des MB</i>	<i>% de racinement</i>	<i>Délai de racinement</i>	<i>Epaisseur des MB</i>	<i>Racinement (%)</i>	<i>Délai de racinement</i>
NPK	Fortified / <i>Fortifié</i> (N1)*	0.0281	19.6	41.5				t = 6.090	7.18	17.18
	Non-fortified / <i>Non fortifié</i> (N2)	0.0115	55.8	31.0	- 59.09	+184.69	- 25.8			
Light / <i>Lumière</i>	Grown in open (L1)*	0.0435	20.8	47.6				t = 10.24	35.72	19.55
	Cultivé à l'extérieur (L1)*									
	Grown under shade (L2)	0.0096	59.6	32.8	- 77.94	+186.53	- 31.09			
	Cultivé à l'ombre (L2)									
Pruning	At 45 cm (H1)	0.0410	35.8	22.8	- 56.75	+293.4	- 52.10	CD= 0.0105	3.74	1.951
Taille	At 90 cm (H2)	0.0666	20.8	27.6	- 29.72	+ 128.57	- 42.01			
	At 180 cm (H3)	0.0947	10.0	46.8	- 0.0	+9.8	- 1.68			
	Light clipping (H4)*	0.0947	9.1	47.6						
	Légère taille (H4)									
Age	2 months / 2 mois (A1)	0.0026	91.6	25.0	- 96.0	+69.31	- 34.2	CD= 0.0012	4.12	2.011
	3 months / 3 mois (A2)	0.0089	80.0	26.3	- 86.0	+47.8	- 30.7			
	6 months / 6 mois (A3)	0.0179	72.9	29.6	72.03	+34.7	- 22.1			
	12 months / 12 mois (A4)	0.0435	63.5	31.3	32.03	+17.31	- 20.2			
	24 months / 24 mois (A5)*	0.0640	54.1	38.0						
Form	Tree * / <i>Arbre</i> (F1) *	0.0690	1.25	49.3				t=17.25	42.33	34.63
	Bush / <i>Buisson</i> (F2)	0.0115	54.1	30.6	- 83.3	+ 422.8	- 37.9			
RH	75-80% (R1)	0.0085	85.5	22.2	- 47.2	77.08	- 33.03	t=7.29	19.31	35.2
	40-50% (R2)*	0.0161	48.0	33.2						

*Control / * *Témoin*

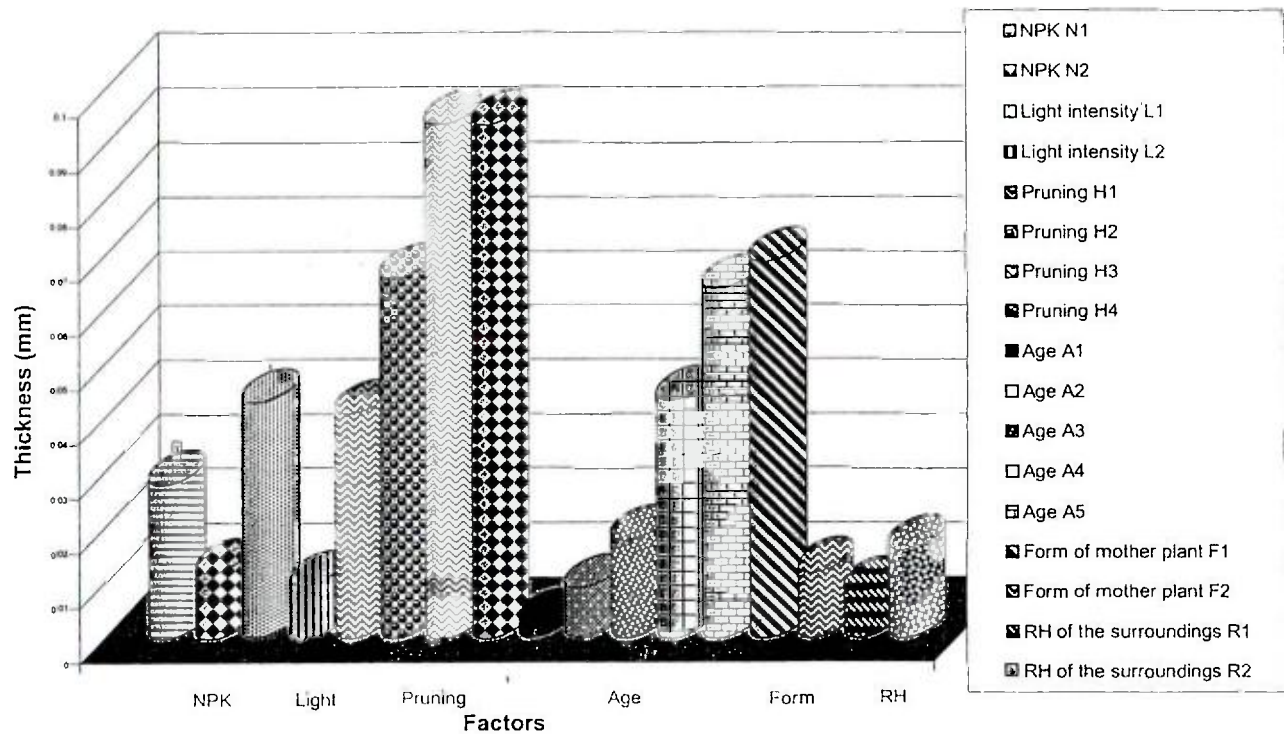


Fig 1. Thickness of collenchymatous and sclerenchymatous layers as influenced by various external factors.

Fig. 1. Epaisseur des couches collenchymateuses et sclérenchymateuses sous l'influence de divers facteurs externes.

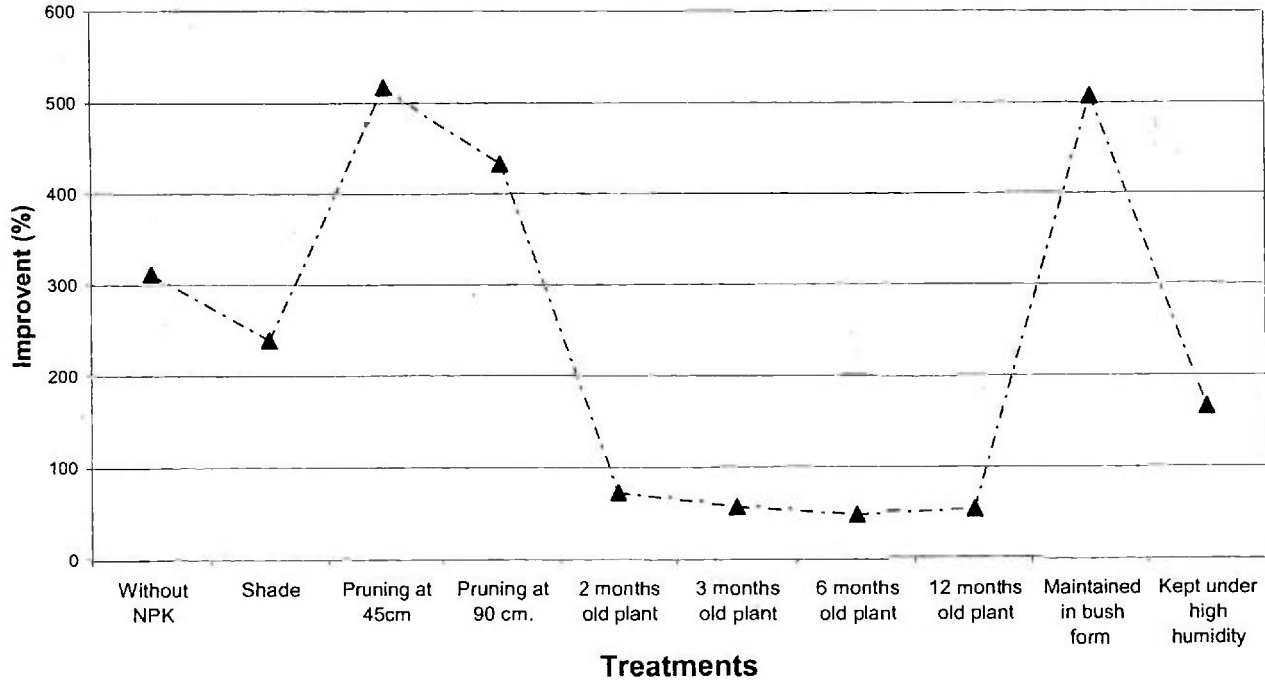


Fig. 2. Efficacy of improvement of rootability per unit reduction of mechanical tissues, under different treatments over their corresponding controls.

Fig. 2. Efficacité d'amélioration du racinement par réduction unitaire des tissus mécaniques avec différents traitements par rapport à leurs témoins correspondants.

- Selecting the young plants.
- Making trees to change to juvenile stage by drastic pruning at 30 cm height.
- Withdrawing the supply of NPK.
- Selecting the plants growing in shade or arranging some artificial shade.
- Maintaining the plants in bush form by repeated pruning at 30 cm height.
- Maintaining high humidity conditions.

REFERENCES

- ALI M.A., PRADHAN M.A. & HAQUE M.A. (1999) Effect of water stress on anatomical characters of root and stem of maize plant. *Indian J. Agric. Res.* 33(4): 245 – 253.
- BOSE T.K., MUKHERJEE T.P. & ROY T. (1975) Standardization under mist, effect of type of wood and size of cutting on the root formation. *The Punjab hort. J.* 15(3&4): 139 – 143.
- CIAMPI C. & CELLINI R. (1963) Anatomical study on the relationship between structure and rooting capacity of olive cuttings. *Nuova Cziorn Bot. Ital* 65: 417 – 425.
- DELARGY J.A. & WRIGHT C.E. (1979) Root formation in the cuttings of the apples in relation to auxin application and to etiolation. *New Phytol* 82: 341 – 47.
- FROLICH E.F. (1961) Etiolation and the rooting of the cuttings. *Proc. Inter Plant Prop. Soc.* 11: 277 – 283
- HANSEN J. (1976) Adventitious root formation induced by gibberellic acid and regulated by irradiance to the stock plant. *Phys. Plant* 36:77-81
- HANSEN J. & ERICKSON (1974) Root formation in pea cuttings in relation to the irradiance of the stock plant., *Phys. Plant* 32: 170 – 73.
- KRAUS E.J. & KRAYBILKL H.R. (1918) Vegetation and reproduction with special reference to the tomato. *Orc. Agric Exp. Sta. Bull.* 149
- LIBBY W.J., BROWN A.G. & FIELDING, J.M. (1972) Effect of hedging on radiata pine on production rooting and early growth of cuttings. *New Zealand Jour. For. Sci* 2(2):263 – 83.
- NANDA, K.K. & KOCHER V.K. (1985) Propagation through cutting in “Vegetative Propagation of Plant”. Kalyani Publisher, Bharatram Road, Daryaganj, New Delhi, pp. 123 – 193.
- PEARS H.L. (1943) The effect of nutrition and phytohormones on the rooting of vine cuttings. *Ann. bot.*, 7: 123 – 32.
- PEARS H.L. (1946) Rooting of vine and plum cuttings as affected by nutrition of parent plant and treatment with phytohormones. *Sci. Bul.* 249 Department of Agr. Union of S. Africa.
- RAJA RAM & SAMSON M. (1995) Rootability behaviour in cuttings of som *Machilus bombycina* King (Lourales:Lauraceae). *India. J. Seric.* 34(1): 54 – 56.
- SING D.K. (1998) Regeneration of guava (*Psidium guajava* L.) cultivars by stooling with the aid of Pactobutrazol. *Ann. Agric. Res.* 19(3): 317 – 320.
- SHANKAR M.A., SHIVASHANKAR, K. & GOWDA, B. (1977) Anatomical and histochemical studies of the mulberry leaves as influenced by deficiencies of macro and secondary nutrients. *Natl. Conf. on Mori. Physiol. Biochem. And Mol. Aspects of stress tolerants. Mulb, Trichinpal.* Feb. 22 – 23, pp. 52.
- SINHA P.S., JOSHI M.C., BECK S., KHARE R. GANGOPADHYAY, A. SINHA, A.K., SINHA B.R.R.P. & THANGAVELU K. (2001) Identification and tackling the factor, hindering the regeneration of *Terminalia arjuna* through cuttings – A breakthrough. *Sericologia. France* 41(2) (In press).
- SINHA P.S., KHARE R., JOSHI M.C., BECK S., GANGOPADHYAY A., SINHA A.K. & SINHA B.R.R.P. (1999) Mechanical barrier to rooting in *Terminalia arjuna* Bedd Curr. Tech. Sem. on Non Mul. Seri. 15th march 1999 Central Tasar Research and Training Institute, Nagri, Ranchi, India.
- WELLESICK S.J. (1952) Rejuvenation of woody plants by formation of spjaeroblasts. *Proc. Konb. Ned. Akad. Wet.* 55: 567 – 73.

ETUDES SUR LES FACTEURS CONTROLANT LE RYTHME DE DEVELOPPEMENT DES TISSUS EMPECHANT LA REGENERATION DE *TERMINALIA ARJUNA* (BEDD) PAR BOUTURES

P. S. SINHA, S. BECK, M. C. JOSHI, A. GANGOPADHYAY, A. K. SINHA & B. R. R. P. SINHA

Central Tasar Research and Training Institute, Piska Nagri, Ranchi, Jharkhand, Inde Pin-835303.

Terminalia arjuna (Bedd.) est une plante hôte primaire du ver à soie tasar *Antheraea mylitta* D. C'est une espèce de plante difficile à raciner et les expériences qui ont été réalisées jusqu'à présent pour la régénérer par boutures n'ont pas abouti à grand chose la plupart ayant échoué. Récemment des études réalisées au **Central Tasar Research and Training Institute**, de Nagri à Ranchi ont révélé que la présence de tissus durs sous forme d'anneaux collenchymateux et sclérénchymateux sert de barrière mécanique à l'émergence de racines à partir de boutures de tige de *T. arjuna*. La rupture de ces barrières mécaniques ou la sélection de matériel ayant peu ou aucune barrière mécanique améliore le racinement à un degré considérable. Les tissus collenchymateux et sclérénchymateux servent principalement de soutien mécanique à la plante et se développent progressivement. Puisque ces tissus se développent progressivement avec la croissance et le développement de la plante, il est probable que ces tissus sont aussi influencés par des facteurs externes variés. Cette étude montre le rôle de divers facteurs environnementaux dans le développement de ces tissus durs et leur relation avec le racinement. Elle propose un protocole pour produire des matériaux végétaux avec peu ou aucune barrière mécanique et s'assurer d'une multiplication facile de *T. arjuna* par boutures. Il faut souligner que la multiplication de *T. arjuna* par boutures a des implications importantes dans l'élevage du tasar telles que la mise au point de variétés améliorées, qui n'a pas pu se faire jusqu'à présent à cause de l'absence d'un outil de multiplication, et le raccourcissement de la trop longue durée de gestation tout en donnant une population uniforme de plantes hôtes pour un élevage plus uniforme.

INTRODUCTION

Terminalia arjuna est une plante hôte primaire du ver à soie tasar tropical *Antheraea mylitta*. C'est l'une des espèces de plantes les plus difficiles à raciner et les expériences qui ont été réalisées jusqu'à présent y compris celles qui ont été entreprises pendant les quarante dernières années au **Central Tasar Research and Training Institute de Ranchi**, l'institution consacrée exclusivement à la recherche et au développement sur le tasar tropical n'ont pas abouti à grand chose et la plupart ont échoué (Sinha et coll., 2000). Le racinement est associé à des facteurs génétiques, anatomiques, physiologiques et biochimiques ou à une combinaison de deux facteurs ou plus. Sinha et coll., (1999, 2000) ont rapporté que chez *T. arjuna* les anneaux collenchymateux et sclérénchymateux servent de barrière mécanique au racinement et la rupture de ces couches / barrières dures ou la sélection de matériau ayant une barrière mécanique mal développée ou sous-développée améliore considérablement le racinement, même jusqu'à 86,6 % dans certains cas. Ciampi et Gellini (1963) ont aussi attribué le mauvais racinement d'*Olea europaea* L. à la présence de cellules de sclérénchymes qui servent de barrière mécanique. Le développement des plantes est influencé par un

certain nombre de facteurs externes et certains d'entre eux sont aussi susceptibles d'influencer le développement de ces tissus mécaniques. En général on rapporte aussi que de nombreux facteurs internes comme l'âge de la plante mère, les conditions nutritionnelles et hormonales de la plante, la maturité des tissus, la lumière, la température, l'eau, etc..., influencent le racinement (Bose et coll., 1991). Hartmann et Kester (1986) ont aussi émis l'opinion que le type de bouture, les hormones de croissance, l'époque de l'année où l'on fait les boutures, l'âge de la plante mère et plusieurs autres facteurs jouent un rôle significatif dans l'induction de racines par ces boutures. Cette étude a été réalisée dans le but d'évaluer l'effet de divers facteurs externes sur le développement de ces tissus / couches durs et pour trouver une relation avec le racinement de sorte qu'on puisse produire un matériel avec peu ou pas de barrière mécanique pour s'assurer d'une multiplication facile et rapide de *T. arjuna* par boutures. Cela permettra de formuler un protocole complet de multiplication végétale de *T. arjuna* par boutures.

MATERIELS ET METHODES

L'étude a été réalisée dans la division Arboricole du *Central Tasar Research and Training Institute*, de Nagri à Ranchi en Inde.

Les facteurs pris en considération pour l'étude sont :

- l'enrichissement de la plante mère en NPK.
- l'intensité lumineuse sous laquelle la plante mère pousse.
- la taille de la plante mère.
- la forme de la plante mère.
- l'âge de la plante mère.
- les conditions hygrothermiques des environs où pousse la plante mère.

Le matériel sélectionné pour l'étude sont des boutures de nœud foliaire de *T. arjuna* ayant leur 3^{ème} au 4^{ème} nœud et une paire de feuilles prises sur des branches du même âge d'environ 2 mois. On étudie anatomiquement ces boutures de nœud foliaire. On procède à des études anatomiques de morceaux de ces boutures sous un microscope en mesurant l'épaisseur des couches collenchymateuses et sclérenchymateuses à l'aide d'un micromètre. On prend l'épaisseur de ces couches comme indicateur du rythme de développement de ces tissus puisque les branches ont le même âge. On procède à une étude du racinement en mettant les boutures dans des sacs en polyéthylène de 30 × 10 cm, remplis de sable stérile, conservés dans des sillons de 2 m × 1 m × 1 m, recouverts de feuilles de polyéthylène transparent. Les boutures et les parois des sillons sont vaporisées avec de l'eau deux à trois fois par jour pour maintenir un niveau d'humidité d'environ 80 à 85 %. On procède à des observations régulières sur l'ébauche de racines. Les traitements pour les différents facteurs sont obtenus comme suit.

Enrichissement en NPK :

La parcelle de la plantation de *T. arjuna* existante, à la population uniforme, est divisée en deux parties. Une partie est enrichie avec la dose NPK recommandée à raison de 100 : 50 : 50 kg / ha / année (N1, témoin) et l'autre partie n'est pas enrichie en engrais (N2). Chaque traitement est répété dix fois.

Intensité lumineuse :

On procède à deux traitements :

- L1. Plantes poussant à l'extérieur recevant une illumination solaire normale (témoin).
- L2. Plantes de la même plantation poussant dans des endroits ombragés.

Taille :

Pour ce facteur, il y a quatre traitements.

H1. Taille à une hauteur de 45 cm.

H2. Taille à une hauteur de 90 cm.

H3. Taille à une hauteur de 180 cm.

H4. Taille légère (témoin).

Chaque traitement est répété cinq fois.

Forme de la plante mère :

Il y a deux traitements comme suit :

F1 : On laisse les plantes pousser librement sans aucun traitement de taille (témoin).

F2 : On conserve les plantes du même lot sous forme de buissons grâce à des tailles répétées à 30 cm de hauteur.

Chaque traitement est répété 10 fois.

Conditions d'humidité de l'environnement :

Il y a deux traitements qui sont les suivants :

T1 : Plantes conservées dans des simulateurs hygrothermiques à environ 75 – 80 % la plupart du temps

T2 : Plantes conservées dans des simulateurs hygrothermiques avec environ 40 à 50 % d'HR (témoin).

Chaque traitement est répété 10 fois. Il y a 24 boutures dans chaque répétition. On étudie l'anatomic et le racinement des boutures d'après les descriptions plus haut.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les données sur les études anatomiques, c'est à dire l'épaisseur des couches collenchymateuses / sclérenchymateuses et sur le racinement des boutures avec les différents traitements sont présentées dans le Tableau I et les figures 1 et 2.

Enrichissement en NPK :

L'observation du Tableau I et de la fig. 1. montre que l'absence d'administration de NPK a considérablement réduit l'épaisseur de ces couches mécaniques, d'environ 59,09 % par rapport à leurs homologues enrichis en NPK. Les lots sans NPK présentent une amélioration du racinement d'environ 184,69%. Le délai de racinement diminue aussi de 25,3 % chez ces lots par comparaison aux homologues auxquels on administre du NPK. Ces observations suggèrent que l'administration de NPK renforce le développement des tissus mécaniques probablement en tant que partie du processus normal de croissance. On a rapporté que la carence en nutriments diminue considérablement l'épaisseur de la zone palissadique chez le mûrier (Shaker et coll., 1997). La suppression de l'apport en azote pourrait aussi avoir dérangé le rapport C : N puisque l'on sait qu'un rapport C : N élevé donne plus de racines (Kaus et Kraybill, 1918). Pears (1943, 1946) a rapporté que la diminution de l'azote chez la plante mère améliore la formation de racines par la bouture.

Intensité lumineuse :

Comme le montre le Tableau I et la fig. 1, l'intensité lumineuse a un effet direct sur le développement des tissus mécaniques puisque l'épaisseur de ces couches diminue de 77,94 % quand on cultive les plantes à l'ombre, par rapport à leurs homologues qui poussent au soleil. La diminution de l'épaisseur de ces couches se reflète par une amélioration considérable du racinement de 186,53 % avec une diminution du délai de racinement d'environ 31,09 %. Nanda et Kocher (1985) ont observé que la diminution de la quantité des tissus mécaniques diminue l'épaisseur des dépôts de la paroi

cellulaire ainsi que la quantité des tissus vasculaires par l'étiollement. Frollich (1961), Delogy et Wright (1979), Johnson et Hamilton (1977) et Singh (1968) ont aussi rapporté l'induction de la formation de racines par l'étiollement. Biran et Halevey (1973) ont trouvé qu'une faible intensité lumineuse chez les plantes mères donne un meilleur racinement. Les observations de Hansen et Erikson (1974) sont presque similaires.

Taille :

La coupe du tronc principal ou d'une partie des branches s'appelle la taille. La taille entraîne une rupture de la dominance apicale et permet le développement d'une bonne quantité de branches / de pousses latérales. Comme le montrent les données, la hauteur de la taille influence aussi le développement des tissus mécaniques. Une taille radicale à 15 cm de hauteur donne la quantité minimum de tissus mécaniques. L'augmentation de la hauteur de la taille augmente l'épaisseur des couches des tissus mécaniques, c'est à dire qu'on enregistre une diminution de 56,75 % à 45 cm contre 29,75 % de diminution à 90 cm. Il est aussi évident d'après le Tableau I que la diminution de l'épaisseur des tissus mécaniques se reflète dûment sur le racinement c'est à dire qu'on remarque une amélioration de 293,4 % et de 128,575 % par rapport au témoin respectivement à 45 et 90 cm. Il apparaît qu'une taille radicale fait regagner de la hauteur au plant à un rythme plus rapide et l'épaississement se produit ensuite. Libby et coll., (1972) ont aussi observé que le potentiel de racinement des boutures se maintient en les taillant. Wellensick (1952) a aussi remarqué que si l'on force la plante mère à rester sous forme juvénile en éliminant les bourgeons ou en la diminuant, cela donne un meilleur racinement.

Forme de la plante mère :

L'observation du Tableau I et de la fig. 1 montre clairement que le maintien des plantes sous la forme de buissons grâce à une taille radicale répétée à 30 cm de hauteur ralentit le rythme de développement des tissus mécaniques et conserve la plante sous sa forme juvénile. Les données montrent que le maintien de la plante sous forme de buisson supprime le développement des couches collenchymateuses et sclérenchymateuses de 83,3 %. Cela entraîne un racinement de 52,18 % contre un racinement de 1,25 % chez les homologues arbres, c'est à dire une amélioration de 422,8 % en 30,6 jours par comparaison à 43 jours chez les arbres normaux. Ainsi, le maintien des plantes sous forme de buissons est une bonne façon d'obtenir un matériel plus tendre avec moins de tissus mécaniques. On attribue cela au fait que les petits buissons ont besoin de moins de force mécanique par comparaison aux arbres et en conséquence le rythme de développement de ces tissus chez l'arbre est beaucoup plus élevé que chez les buissons. Libby et coll., (1972) ont observé qu'on peut maintenir le potentiel de racinement des boutures en les taillant. Wellensick (1962) a aussi remarqué que si l'on force la plante mère à rester sous forme juvénile en éliminant les bourgeons ou en la diminuant, cela donne un meilleur racinement.

Age de la plante mère :

Comme on peut le voir d'après les données, l'âge de la plante mère a un effet direct sur le rythme de développement des tissus mécaniques puisque l'épaisseur des tissus mécaniques augmente avec l'âge de la plante mère de 2 mois à 2 ans. Les plantes de 2 ; 3 ; 6 et 12 mois ont 96 ; 86 ; 72,03 ; 32,03 % de barrières mécaniques en moins que le témoin de 24 mois et cela se reflète dûment sur le racinement, qui enregistre une amélioration respectivement de 63,31 ; 47,8 ; 34,7 et 17,3 %. Le délai de racinement augmente avec l'augmentation de l'âge de la plante mère. Rajaram et Samson (1995) ont observé la diminution du racinement avec l'âge de la plante chez *Som*, cependant, ils n'ont pas expliqué pourquoi.

Conditions hygrothermiques de l'environnement :

Comme le montrent le Tableau I et la fig. 1, le maintien de la plante dans un environnement humide (H. R. comprise entre 80 à 90 %) diminue le développement des tissus mécaniques (d'environ 47,2 %). Ces observations vont de pair avec celles d'Ali et coll., (1999) qui ont trouvé que l'épaississement secondaire ainsi que le nombre de cellules sclérenchymateuses de la gaine du faisceau vasculaire deviennent maximum dans une situation de détrempe et modérés dans des conditions d'humidité naturelle de saturation du sol. Une bonne condition d'humidité améliore le racinement d'environ 33,03 %.

Relation quantitative entre la diminution de la barrière mécanique et le racinement :

L'efficacité de l'amélioration du racinement en fonction de la réduction unitaire de la barrière mécanique est présentée dans la fig. 2. On peut clairement voir que la réduction de la quantité des tissus mécaniques n'est pas toujours proportionnelle à l'amélioration du racinement. L'amélioration du racinement en fonction de la réduction unitaire de l'épaisseur de la barrière mécanique varie considérablement avec les différents facteurs. L'efficacité est maximum avec la diminution de la hauteur de la taille soit par taille radicale ou répétée, suivie par la suppression de NPK et l'ombre, etc.. Cela indique que l'induction du racinement par différents facteurs n'est pas simplement une question mécanique mais un processus chimio-mécanique. La diminution de la quantité des tissus mécaniques peut être accompagnée par des changements favorables de l'état physiologique et biochimique mais à un degré variable. C'est la raison pour laquelle la diminution de la quantité des tissus mécaniques n'est pas toujours proportionnelle à l'amélioration du racinement. Une taille radicale semble être la plus efficace suivie par la suppression de l'apport en NPK.

Cette étude montre clairement qu'on peut obtenir un matériel avec peu de barrières mécaniques en altérant les facteurs externes. Le racinement est fortement lié à cette barrière mécanique ainsi on peut obtenir une bouture de tige adaptée pour avoir une bonne régénération en :

- sélectionnant de jeunes plants.
- ramenant les arbres à un stade juvénile grâce à une taille radicale à 30 cm.
- supprimant l'apport en NPK.
- sélectionnant des plants poussant à l'ombre ou en fournissant une ombre artificielle.
- maintenant les plants sous forme de buisson grâce à une taille répétée à 30 cm de hauteur.
- maintenant des conditions d'humidité élevée.

INTROGRESSION OF SEX-LIMITED MARKER TRAIT INTO MDPSY, A PROMISING POLYVOLTINE SILKWORM STRAIN

C.G.P. RAO*, CHANDRASHEKHARAIHAH, IBRAHIM BASHA, H. NAGARAJU & A. K. GOEL

Andhra Pradesh State Sericulture Research & Development Institute, Kirikera,
Hindupur - 515 211, Andhra Pradesh, India.

*A female specific sex-limited larval marking trait has been successfully introgressed into a promising, high-yielding and elite polyvoltine silkworm (**Bombyx mori**.) strain, MDPSY maintained in the germplasm stock of APSSRDI. MDPSY larvae are plain without any larval markings. Another polyvoltine strain PMSL, which has female specific body marking genes on its W chromosome was chosen as donor parent and the larval markings were transferred into the plain female larvae of MDPSY by means of introgressive hybridization and recurrent backcrossing methods and a new sex-limited silkworm strain SLSY has been synthesized. Hybrid performance and heterosis of SLSY hybrid was studied for various economically important quantitative traits and economic importance of this sex-limited strain has been discussed. The newly developed sex limited strain SLSY and its hybrid combinations are found significantly superior than the donor parent (PMSL) and control hybrid (PM × NB4D2) respectively in overall performance and mid and better parent heterosis of many important quantitative traits indicating its suitability to use as one of the parents in commercial hybrid preparations.*

Keywords: Sex-limited trait, Larval markings, W Chromosome, gene introgression, APSSRDI.

INTRODUCTION

Importance of hybrid vigour in silkworms was realized nearly a century back (Toyama, 1906). Utilization of hybrid vigour has come into practice since many decades in the field of sericulture. The usual procedure to prepare a cross breed is mating of a polyvoltine female parent with a bivoltine male parent due to known genetic reasons (Nakada, 1972; Tazima, 1988; Murakami, 1989). Thousands of disease free egg layings of cross breed (CB) are to be prepared to fulfill the needs of sericulture farmers. For the preparation of hybrid layings in large scale, separation of males and females is necessary to avoid self-mating within the strain. Sex separation at larval stage is not easy because the sexual spots found on the ventral side of the larval abdomen are too tiny to observe with naked eyes (in case of male larva, a tiny spot or Herald's imaginal median bud is situated at the junction of the 8th and 9th abdominal segments and in case of females, four white spots or Ishiwata's imaginal buds are found on the 8th and 9th abdominal segments). Hence, due to these practical difficulties, sex separation is usually done at pupal stage where the sexual markings are more prominent and relatively easy to identify. To obtain pupae for sex separation, each cocoon has to be cut open individually, which is highly laborious, time and cost consuming method. Moreover, some pupae are also damaged due to erroneous cocoon cutting and preservation. Male and female sex separation can also be done based on physical weight of the cocoons, because female cocoons are

* Corresponding author e-mail: gprao007@rediffmail.com.

usually heavier than males. This method cannot always be correct because, some times the weight difference between male and female larvae or cocoons will be negligible or even overlap. All these traditional methods have practical difficulties and are time, labour and cost consuming. These practical problems can be overcome through economically potential genetic applications like the development of sex limited larval marking silkworm strains, which will ease the labour and cost in large scale grainage operations during hybrid egg laying preparations.

Andhra Pradesh is the second largest sericulture state in India. Though millions of cross breed layings are prepared every year, there is no potential sex-limited strain for practical use in Sericulture Industry. Keeping the need and said practical problems in view, the present attempt has been made to synthesize a sex-limited polyvoltine strain known as SLSY.

MATERIALS AND METHODS

For the introgression of sex-limited larval markings, an elite polyvoltine strain MDPSY (Fig-1) was used as recurrent parent (recipient) for the transfer of female specific larval markings. It is a newly synthesized line from Madagascar hybrid (Chandrashekharaiyah *et. al.*, 2000), which is superior in quantitative and qualitative parameters. Another polyvoltine strain PMSL (Fig-2) that carries female specific larval marking genes on its W chromosome and indigenous to Karnataka was selected as donor parent. The female parent of PMSL and male parent of MDPSY were hybridized and the resulting recombinant population was reared in three replications under standard rearing conditions as per Krishna Swamy (1978). In F₁ generation, all the females have showed larval markings on the dorsal surface of their bodies and the males were devoid of any larval markings. The selected F₁ females were back-crossed (BC) to the males of MDPSY and selection was carried out keeping the desired traits of recurrent parent in view. Recurrent backcrossing was continued till the desired traits of recurrent parent and the larval markings of the donor parent were obtained. Backcrossing was discontinued at 4th generation since the line became nearly isogenic with the recurrent parent, incorporating the sex-limited female specific larval markings of donor parent. Selective inbreeding was continued up to 8 generations among cellular families to fix the desired traits, as given in Flowchart. In all the stages of breeding, important quantitative parameters of both male and female sex, viz., fecundity, sex-ratio, larval period, cocoon yield, pupation rate, cocoon weight, cocoon shell weight, cocoon shell ratio were recorded and analyzed (Table I).



Fig. 1. MDPSY larvae without any larval markings.

Fig. 1. Larves MDPSY sans aucun marquage larvaire.

Breeding plan for introgression of sex-limited trait
into normal silkworm strain

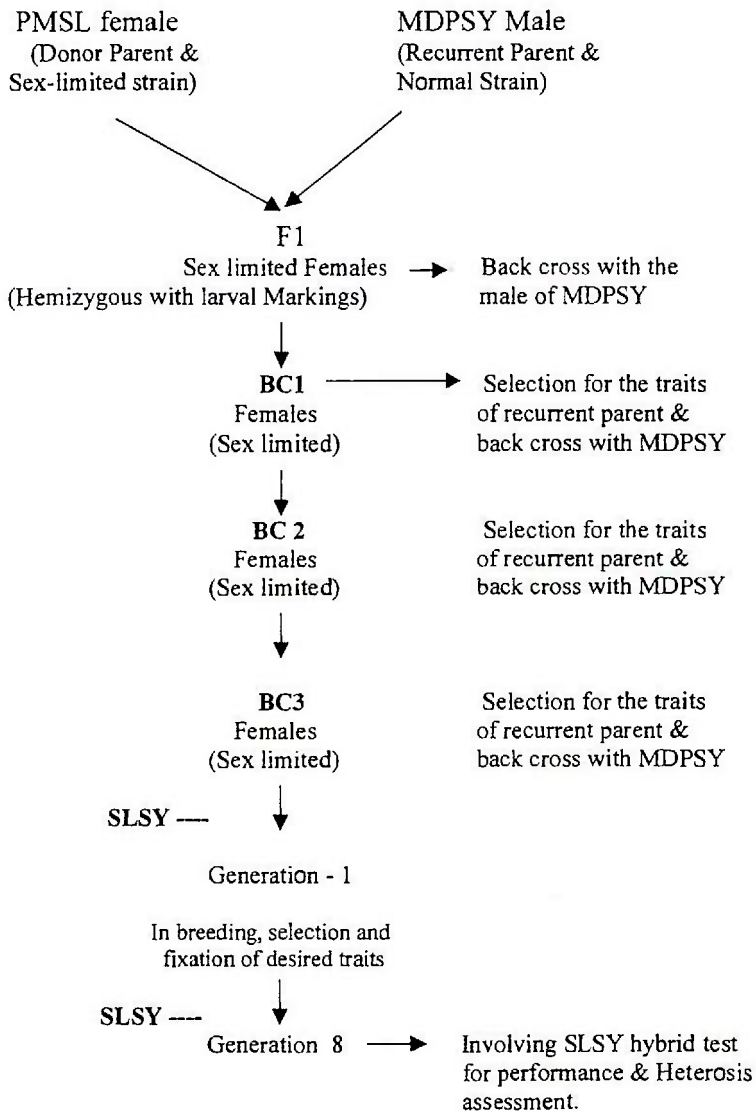


Table I. Performance of parents and new sex limited strain, SLSY.

Tableau I. Performance d'élevage des parents et nouvelle souche limitée au sexe SLSY

Line Combination	Sex	Fecundity F : M	Sex ratio F : M	Larval period		Yield /10000 larvae		Pupation rate	Cocoon parameters		
				V instar (D : H)	Total (D : H)	No.	Wt. (kg)		Sc. wt	Ss. Wt	SR%
Combinaison de lignées	Sexe	Fécondité F : M	Ratio sexuel F : M	Durée larvaire		Rendement /10 000 larves en nbre en pds.	Taux de Nymphose		Paramètres du cocon		
				Vème âge (J : H)	Totale (J : H)				Sc. wt	Ss. Wt	SR%
PSML	Female / Femelle	415	1 : 1.04	6 : 16	24 : 20	8859	10.309	83.70	1.226	0.179	14.60
	Male / Mâle			6 : 08	24 : 12	9271	10.082	89.06	1.142	0.174	15.24
Average / Moyenne		415		6 : 12	24 : 16	9065	10.195	86.38	1.184	0.177	14.91
MDPSY		450		5 : 20	22 : 16	9601	12.848	94.60	1.356	0.221	16.30
PMSL x MDPSY	Female / Femelle	448	1 : 1.03	6 : 04	23 : 04	9069	12.756	88.24	1.449	0.226	15.60
	Male / Mâle			6 : 00	23 : 00	9431	12.103	92.89	1.321	0.231	17.49
Average / Moyenne		448		6 : 02	23 : 02	9253	12.651	90.60	1.385	0.229	16.50
BC1	Female / Femelle	452	1 : 1.02	6 : 08	24 : 12	9194	12.452	89.10	1.396	0.203	14.54
	Male / Mâle			6 : 04	24 : 08	9452	11.732	93.15	1.274	0.211	16.56
Average / Moyenne		452		6 : 06	24 : 10	9326	12.303	91.16	1.335	0.207	15.51
BC2	Female / Femelle	453	1 : 1.03	6 : 16	24 : 20	9159	12.490	88.32	1.406	0.201	14.30
	Male / Mâle			6 : 08	24 : 12	9234	12.222	90.09	1.362	0.219	16.08
Average / Moyenne		453		6 : 12	24 : 16	9197	12.356	89.20	1.384	0.210	15.17
BC3	Female / Femelle	432	1 : 1.04	5 : 18	22 : 06	9406	12.560	90.59	1.379	0.202	14.65
	Male / Mâle			5 : 12	22 : 00	9491	11.548	91.67	1.261	0.21	16.65
Average / Moyenne		432		5 : 15	22 : 03	9448	12.054	91.13	1.320	0.206	15.61
SLSY G1	Female / Femelle	436	1 : 1.04	6 : 04	23 : 04	9340	12.534	89.85	1.387	0.212	15.28
	Male / Mâle			5 : 20	22 : 20	9437	11.121	91.55	1.219	0.221	18.13
Average / Moyenne		436		6 : 00	23 : 00	9388	11.828	90.70	1.303	0.217	16.62
G2	Female / Femelle	453	1 : 1.02	6 : 04	23 : 04	9194	12.238	87.20	1.377	0.21	15.25
	Male / Mâle			6 : 00	23 : 00	9444	11.417	91.67	1.245	0.214	17.19
Average / Moyenne		453		6 : 02	23 : 02	9321	12.039	89.46	1.311	0.212	16.17
G3	Female / Femelle	450	1 : 1.01	6 : 08	24 : 12	9471	13.046	92.79	1.412	0.219	15.51
	Male / Mâle			6 : 04	24 : 08	9668	12.591	93.84	1.342	0.232	17.29
Average / Moyenne		450		6 : 06	24 : 10	9570	13.025	93.32	1.377	0.226	16.38
G4	Female / Femelle	458	1 : 1.03	6 : 16	24 : 20	9108	12.572	87.79	1.423	0.221	15.53
	Male / Mâle			6 : 08	24 : 12	9269	12.061	89.50	1.346	0.231	17.16
Average / Moyenne		458		6 : 12	24 : 16	9190	12.517	88.66	1.385	0.226	16.32
G5	Female / Femelle	449	1 : 1.05	6 : 04	23 : 04	9469	12.344	91.30	1.346	0.209	15.53
	Male / Mâle			6 : 00	23 : 00	9630	11.814	93.98	1.265	0.219	17.31
Average / Moyenne		449		6 : 02	23 : 02	9551	12.286	92.67	1.306	0.214	16.39
G6	Female / Femelle	428	1 : 1.07	5 : 16	20 : 12	9175	11.491	88.66	1.298	0.211	16.26
	Male / Mâle			5 : 08	20 : 04	9378	11.035	91.39	1.221	0.209	17.12
Average / Moyenne		428		5 : 12	20 : 08	9280	11.482	90.07	1.260	0.210	16.67
G7	Female / Femelle	456	1 : 1.06	6 : 00	22 : 20	9234	11.672	89.47	1.306	0.213	16.31
	Male / Mâle			5 : 16	22 : 12	9276	11.418	90.95	1.265	0.221	17.47
Average / Moyenne		456		5 : 20	22 : 16	9256	11.746	90.23	1.286	0.217	16.88
G8	Female / Femelle	451	1 : 1.01	6 : 04	23 : 04	9484	12.167	91.55	1.324	0.201	15.18
	Male / Mâle			5 : 20	22 : 20	9537	11.724	93.98	1.266	0.211	16.67
Average / Moyenne		451		6 : 00	23 : 00	9510	11.945	92.77	1.295	0.206	15.91

SC. Wt : Single cocoon weight / Poids d'un cocon. Ss Wt. : Single shell weight / Poids d'une coque. SR % : Cocoon shell ratio. / Richesse soyeuse du cocon. BC: Backcross: Retrocroisement. G: Generation.



Fig. 2. PMSL – Female larvae with sex-limited larval markings.

Fig. 2. Larves femelles PMSL avec des marquages larvaires limités au sexe.



Fig. 3. SLSY – Newly synthesized sex-limited marker strain.

Fig. 3. SLSY – Souche à marquage limité au sexe nouvellement mise au point.

At eighth generation, for studying its hybrid performance, the new sex-limited strain, SLSY (Fig-3) was crossed with three different bivoltine testers (SPC, TR and NB4D₂) and the resultant F₁ disease free layings were reared under standard rearing conditions in three replications along with control hybrid, PM x NB4D₂. Average Hybrid performance, mid and better parent heterosis (Table II) were calculated for nine important quantitative traits viz., fecundity, 5th age larval duration, total larval duration, yield/10000 larvae by number & by weight, pupation rate, single cocoon weight, single shell weight and cocoon shell ratio (%). Average Evaluation Index was also calculated on the basis of their performance on the above nine characters (Table III) to evaluate the hybrid combinations.

RESULTS AND DISCUSSION

Tanaka (1916) observed that the sex chromosomes in silkworm are ZZ in the male and ZW in the female. The male silkworms are homogametic since they produce only one type (Z) of gametes and the females are heterogametic since they produce both Z and W type of ova. In the silkworm many genes controlling the morphological and quantitative traits are located on the Z chromosomes, but no genes coding for quantitative traits are found on the W chromosome. However, Hasimoto (1933) demonstrated that the W chromosome determines trait of female sex.

Table II. Mean performance and Mid and Better Parent Heterosis values of SLSY hybrids.

Tableau II. Performance moyenne et valeurs d'hétérosis médiane et meilleure des parents chez les hybrides SLSY.

Sl No.	Hybrids Hybrides	Fecundity Fécondité			Lar. Dur. V instars (Hrs) Durée larvaire du Vème âge (hrs)			Total Lar. Dur (Hrs) Durée larvaire totale (hrs)			Cocoon yield /10,000 larvae Rendement en cocons / 10 000 larves					
											By number En nombre			By weight (kg) En poids (kg)		
		F1	MPH	BPH	F1	MPH	BPH	F1	MPH	BPH	F1	MPH	BPH	F1	MPH	BPH
1	SLSY × SPC	452	— 8.20	— 16.85	132	14.29	— 8.33	540	3.91	2.17	9400	3.810	3.410	17.107	23.88	3.25
2	SLSY × TR	445	— 8.84	— 16.76	132	14.29	— 8.33	540	3.91	2.17	9307	4.160	2.384	17.026	22.91	2.23
3	SLSY × NB4D2	449	— 8.11	— 16.17	140	11.39	— 2.78	548	3.18	0.72	9247	3.724	1.727	17.489	25.36	3.78
4	PM × NB4D2	433	— 10.33	— 19.28	180	0.00	— 4.65	588	0.00	— 1.38	9020	— 0.111	— 3.219	17.083	30.22	1.37

Tableau II. Continued / Tableau II. Suite.

Sl No.	Hybrid Hybride	Pupation Rate Taux de nymphose			Single Coc. Wt. (g) Poids d'un cocon (g)			Single shell wt. (g) Poids d'une coque (g)			Coc. Shell ratio (%) Richesse soyeuse du cocon		
		F1	MPH	BPH	F1	MPH	BPH	F1	MPH	BPH	F1	MPH	BPH
1	SLSY × SPC	92.00	5.75	3.84	1.845	18.184	— 0.913	0.342	22.143	— 2.8409	18.54	4.719	— 1.905
2	SLSY × TR	90.40	5.12	4.39	1.863	16.718	— 3.589	0.338	19.131	— 6.0185	18.16	3.349	— 2.575
3	SLSY × NB4D2	90.53	6.01	6.01	1.931	19.817	— 1.630	0.337	20.036	— 4.8023	17.44	1.064	— 3.165
4	PM × NB4D2	89.47	2.01	— 0.59	1.927	27.955	— 1.834	0.323	26.543	— 8.7571	16.70	1.290	— 7.274

MPH: Mid parent heterosis / Heterosis médiane du parent. BPH: Better parent heterosis / Heterosis meilleure du parent.

Table III. Average hybrid performance and evaluation index of the hybrids.

Tableau III. Performance moyenne des hybrides et indice d'évaluation des hybrides.

Sl. No.	Combinations	Fecundity	Larval period <i>Durée larvaire</i>		Yield /10 000 larvae <i>Rendement / 10 000 larves</i>		Pupation rate	Cocoon assesment <i>Evaluation des cocons</i>			
<i>No. Combinaisons de série</i>		<i>Fécondité</i>	<i>V age</i> (D : H) (J : H)	<i>total</i> (D : H) (J : H)	<i>No. en nbre</i>	<i>Wt. (kg) en pds (kg)</i>	<i>Taux de nymphose</i>	<i>Sc wt. (g)</i>	<i>Ss wt. (g)</i>	<i>SR %</i>	<i>Avge EI</i>
1	SLSY × SPC	452 ± 2.02	5 : 12	22 : 12	9400 ± 23.09	17.107 ± 0.06	92.20 ± 0.61	1.845 ± 0.003	0.342 ± 0.002	18.54 ± 0.139	55.39
2	SLSY × TR	445 ± 1.76	5 : 12	22 : 12	9307 ± 93.33	17.026 ± 0.22	90.40 ± 0.69	1.863 ± 0.005	0.338 ± 0.002	18.16 ± 0.070	51.16
3	SLSY × NB4D2	449 ± 1.45	5 : 16	22 : 20	9247 ± 13.33	17.489 ± 0.13	90.53 ± 0.13	1.931 ± 0.003	0.337 ± 0.002	17.44 ± 0.115	53.63
4	PM × NB4D2	433 ± 3.48	7 : 08	24 : 12	8973 ± 81.10	17.083 ± 0.08	89.47 ± 0.58	1.927 ± 0.006	0.323 ± 0.005	16.78 ± 0.206	39.82
	C. D. at 5%	7.673	-	-	248.062	0.268	2.11	0.008	0.01	0.522	

SC WT : Single cocoon weight / *Poids du cocon.*SS WT : Single cocoon shell weight / *Poids d'une coque.*SR % : Cocoon shell ratio / *Richesse soyeuse du cocon.*AVG EI : Average of evaluation index / *Indice d'évaluation moyen.*

Tazima in 1941 had successfully translocated the gene coding for larval marking ($+^P$) from the 2nd chromosome to the W chromosome by X-ray irradiation method. Later, Tazima (1951), Tazima *et. al.*, (1951) translocated the dominant egg colour gene ($+^{W_2}$) from 10th chromosome to W chromosome. Hasimoto (1948), Kimura *et. al.*, (1971) have developed sex specific zebra larval markings and cocoon colour strains. In Japan, after 1970 onwards sex-limited strains have been fully exploited. Fifty percent of the hybrids raised in Japan come from the source of sex-limited strains, because of their ease in handling (Mano, 1984). Moreover, a true hybrid (crossing of virgin multivoltine female with a bivoltine male) can be prepared by adopting sex-limited strains, which is not possible in conventional method of sex separation, where there is a possibility of some self mating. Though India is the second largest silk producer of the world, only few sex-limited strains have been developed (Sengupta, 1968 and Nagaraju *et. al.*, 1990) and their practical use is also scanty. Keeping the necessity of sex-limited strains in view, in the present exercise, a sex limited silkworm strain, SLSY has been synthesized carrying female specific larval markings (eye spot, crescent mark and star spot markings (ECS) on the dorsal surface of its body using indigenous PMSL strain as donor parent. The trait has been introgressed by recurrent backcrossing method, which is most effective and also extensively used for the improvement of crop plants and animals. Performance of the new sex-limited strain at different generations of breeding is presented in Table I. The result indicate that when compared with the PMSL, the donor parent, there is a significant increase in the quantitative traits of SLSY which include fecundity, larval duration, larval weight, pupation rate, cocoon yield, cocoon weight, cocoon-shell weight, and cocoon-shell ratio. Overall, the total larval duration of the new strain is found to be decreased by more than 30 hrs than the donor parent. Some breeders believe that the female mortality is higher in sex-limited strains because the females are heterogametic (ZW) and may be due to lethal and sub lethal genes located on Z chromosome in hemizygous condition. In the present sex-limited strain, SLSY, the female larval mortality is not found higher than males. The male and female viability lies within the usual range as in other hybrids.

Hybrid performance of SLSY was studied using three bivoltine testers; SPC, TR and NB4D2. The performance of SLSY hybrid combinations is found better, when compared with that of control hybrid (PM $\times$ NB4D2). Significant gain is noticed in the overall performance and mid and better parent heterosis of many quantitative traits. The F1 generation performance, mid and better parent heterosis values are presented in Table II. A good amount of heterosis was recorded for all the parameters except the fecundity, where it is found to be negative because in the hybrid combinations multivoltine strain is always taken as female parent and bivoltine as male parent. Maximum amount of mid parent heterosis (MPH) was recorded for cocoon yield by weight (23-30%) followed by cocoon weight (17-28%) and shell weight (19-26%) though it was high in control. Incase of larval duration (5th instar and total larval duration), though the heterosis (MPH) recorded is moderate but total difference of 40 hrs reductions in larval duration is very significant from the practical point of view for sericulture farmers. Similarly 5% gain in cocoon shell ratio also increases the silk recovery substantially in SLSY $\times$ SPC combination.

SLSY combinations have expressed a positive better parent heterosis (BPH) for total larval duration, cocoon yield by number, cocoon yield by weight and pupation rate which shows that these cross breeds have performed better than their bivoltine parents. On the other hand, the control hybrid (PM $\times$ NB4D2) has expressed negative BPH for most of the traits except for cocoon yield by weight. The mean performance of the four hybrid combinations, along with their standard error and critical difference (CD) generated from ANOVA and average evaluation index (E I) are presented in Table III. The average evaluation Index has been calculated using multiple trait index method (Mano *et. al.*, 1992). The SLSY $\times$ SPC combination has performed best in seven characters out of the nine studied. Though the remaining two characters, yield by weight and single cocoon weight are found better in SLSY $\times$ NB4D2 cross, overall evaluation index value of SLSY $\times$ SPC is highest because of superiority of other quantitative traits. ANOVA showed significant difference for all the characters except for the trait pupation rate. However, the pupation rate of SLSY $\times$ SPC is found higher than

control. SLSY × SPC, SLSY × TR have showed shorter larval duration of 2 days which is highly beneficial factor for the farmers, because it reduces mulberry leaf consumption, larval exposure to pathogens and labour cost. Analysis of variance was not done for the larval duration because of static replicated values for each hybrid combination. The average evaluation index indicated that SLSY combinations are superior to the control hybrid. The combination SLSY × SPC stands first in performance (E.I. = 55.39) followed by SLSY × NB₄D₂ (E.I. = 53.63) and SLSY × TR (E.I. = 51.16). The present study clearly indicates that the newly synthesized sex-limited strain, SLSY is found promising with good combining ability, quantitative and qualitative traits with lesser larval duration. Hence, the sex-limited strain may safely and effectively be used for the preparation of silkworm cross breed egg layings for commercial exploitation which in turn will save lot of labour, cost and time involved in large-scale grainage operations.

REFERENCES

- CHANDRASHEKHARAI AH, SIVAPRASAD V., LAKSHMI H., & BASHA K. I. (2000) Development of silkworm breeds suitable for Andhra Pradesh conditions. Presented at 4th China International Silk Conference, Yinchuan, Ningxia, PRC 2000.
- HASIMOTO H. (1933) Genetical studies on the tetraploid female in the silkworm. Bull. Seric. Exp. Stn., 8:359-381.
- HASIMOTO H. (1948) Sex limited Zebra, an X-ray mutation in the silkworm. J. Seric. Sci. Jpn., 16:62-64.
- KIMURA K., HARADA C. & AOKI H. (1971) Studies on the W chromosome translocation of yellow blood gene in the silkworm. Jpn. J. Breed., 21:199-203.
- KRISHNASWAMY (1978) New technology of silkworm rearing. Indian silk, 17(1):17-21.
- MANO Y. (1984) Studies on the breeding of auto sexing silkworm races in Japan. Sericologia, 24(3):389-392.
- MANO Y., NIRMAL KUMAR S., BASAVARAJA H. K., MAL REDDY N. & DATTA R.K. (1992) An index for multiple trait selection for silk yield improvement in *Bombyx mori* (L). Nat. Conf. Mulb. Seric. Res., CSR & TI, Mysore, p116.
- MURAKAMI A. (1989) Genetical studies on tropical races of silkworm, *Bombyx mori*, with special reference to cross-breeding strategy between tropical and temperate races. JARQ., 23:123-127.
- NAGARAJU J., PREMALATHA V., RAVINDER SINGH, NOAMANI M.K.R. & JOLLY M.S. (1990) Isolation of a polyvoltine strain with sex-limited larval markings in silkworm, *Bombyx mori*. (Lepidoptera: Bombycidae) Sericologia, 29(4):495-502.
- NAKADA T. (1972) Investigation of sex-limited heredity cocoon weight in the silkworm, *Bombyx mori*. J. Fac. Agric. Hokkaido Univ., 57(1):41-50.
- SENGUPTA K. (1968) Sex-limited characters in two races of silkworm *Bombyx mori*. Indian J. of Seric., 1:79-86.
- TANAKA Y. (1916) Genetic studies in the silkworm. J. Coll. Assoc. Sapporo., 7:129-255.
- TAZIMA Y. (1941) A simple method of sex discrimination by means of larval markings in *Bombyx mori*. J. Seric. Sci. Jpn., 12:184-188.
- TAZIMA Y. (1951) Separation of male and female silkworms in egg stage now becomes possible. Silk Dig., Tokyo, 61:1-3.
- TAZIMA Y., OHTA N. & HARADA C. (1951) On the discrimination method by colouring gene of silkworm eggs. Inductions of translocation between the W and the 10th chromosome. Jpn. J. Breed., 1:47-50.
- TAZIMA, (1988) A view on the improvement of Measure breed. International Congress on Tropical Sericulture, A meeting report, Bangalore, India.
- TOYAMA K. (1906) Studies on the hybridology of insects I. On silkworm crosses with special reference to Mendel's laws of heredity. Bull. Coll. Agric., Tokyo Univ., 7:259-393.

INTROGRESSION D'UN CARACTERE MARQUEUR LIMITE AU SEXE CHEZ MDPSY, UNE SOUCHE DE VER A SOIE POLYVOLTINE PROMETTEUSE

C. G. P. RAO*, IBRAHIM BASHA H., NAGARAJU & A. K. GOEL

Andhra Pradesh State Sericulture Research & Development Institute, Kirikera,
Hindupur – 515 211, Andhra Pradesh, Inde.

*On a réussi l'introgression avec succès d'un caractère de marquage larvaire limité au sexe spécifique à la femelle chez une souche du ver à soie (**Bombyx mori**) polyvoltine, supérieure et prometteuse, à rendement élevé, MDPSY, maintenue dans la banque génétique de l'APSSRDI. Les larves MDPSY sont unies sans aucun marquage larvaire. On a choisi comme parent donneur une autre souche polyvoltine PMSL, qui a des gènes de marquage sur le corps spécifiques à la femelle sur son chromosome W et les marquages larvaires sont transférés chez les larves femelles unies de MDPSY grâce à une hybridation introgressive et des méthodes de croisement de retour récurrentes. On a mis au point une nouvelle souche de ver à soie limitée au sexe, SLSY. Nous avons étudié la performance et l'hétérosis de l'hybride SLSY pour divers traits quantitatifs importants sur le plan économique et discutons de l'importance économique de cette souche limitée au sexe. On trouve que la souche limitée au sexe SLSY nouvellement mise au point et ses combinaisons hybrides sont significativement supérieures par rapport au parent donneur (PMSL) et à l'hybride témoin (PM × NB4D2) respectivement pour la performance générale et pour l'hétérosis moyenne et meilleure des parents pour de nombreux caractères quantitatifs importants, ce qui indique qu'elle est adaptée à être utilisée comme l'un des parents dans les préparations d'hybrides commerciaux.*

INTRODUCTION

Il y a presque un siècle qu'on a pris conscience de l'importance de la vigueur hybride chez les vers à soie (Toyama, 1906). On utilise la vigueur hybride depuis plusieurs décennies dans le domaine de la sériciculture. La procédure habituelle pour préparer une lignée poly × bi (cross breed) est l'accouplement d'un parent femelle polyvoltin avec un parent mâle bivoltin pour des raisons génétiques (Nakada, 1972 ; Tazima, 1988 ; Murakami, 1989). Des milliers de pontes saines de cross breed (CB) doivent être préparées pour répondre aux besoins des sériciculteurs. Pour la préparation des pontes hybrides à grande échelle, il est nécessaire de séparer les mâles des femelles pour éviter l'auto-accouplement dans la souche. Il n'est pas facile de séparer les sexes au stade larvaire parce que les taches sexuelles que l'on trouve sur le côté ventral de l'abdomen de la larve sont trop minuscules pour les observer à l'œil nu (chez les larves mâles, une minuscule tache ou bouton médian imaginal d'Herald est situé à la jonction des 8^{ème} et 9^{ème} segments abdominaux et chez les femelles on trouve quatre taches blanches ou boutons imaginaires d'Ishiwata sur les 8^{ème} et 9^{ème} segments abdominaux). Ainsi, en raison de ces difficultés pratiques, on procède à la séparation sexuelle au stade nymphal pendant lesquels les marques sexuelles sont plus évidentes et sont relativement faciles à identifier. Pour obtenir des nymphes pour la séparation des sexes, il faut ouvrir chaque cocon individuellement,

* Email de l'auteur auquel adresser la correspondance : gprao007@rediffmail.com.

ce qui est une méthode laborieuse, qui prend du temps et coûte cher. De plus, on abîme aussi certaines nymphes si les cocons sont mal conservés ou mal coupés. On peut aussi séparer les sexes sur la base du poids des cocons, parce que les cocons femelles sont en général plus lourds que les cocons mâles. Cette méthode n'est pas toujours correcte parce que parfois la différence de poids entre les larves ou les cocons mâles et femelles est négligeable. Toutes ces méthodes traditionnelles présentent des difficultés sur le plan pratique et demandent du temps, de la main-d'œuvre et coûtent cher. On peut surmonter ces problèmes pratiques grâce à des applications génétiques au potentiel économique comme la mise au point de souches de vers à soie à marquage larvaire limité au sexe, ce qui aurait une répercussion positive sur la main d'œuvre et sur le coût des opérations de grainage à grande échelle pendant les préparations de pontes hybrides.

L'Andhra Pradesh est le deuxième état séricicole le plus grand en Inde. Bien que l'on prépare des millions de pontes cross breed chaque année, il n'existe pas de souche limitée au sexe pour un usage pratique potentiel dans l'industrie séricicole. Nous avons essayé de mettre au point une souche polyvoltine limitée au sexe appelée SLSY, en tenant compte des besoins et des problèmes pratiques.

MATERIELS ET METHODES

Pour l'introgession des marquages larvaires limités au sexe, on utilise une souche polyvoltine supérieure MDPSY (Fig. 1) comme parent récurrent (receveur) pour le transfert des marquages larvaires spécifiques femelles. C'est une lignée nouvellement mise au point à partir d'un hybride de Madagascar (Chandrashekharaiya et coll., 2000), qui est supérieur pour ses paramètres quantitatifs et qualitatifs. On sélectionne comme parent donneur une autre souche polyvoltine PMSL qui vient du Karnataka (fig. 2) qui porte les gènes de marquage larvaire spécifiques à la femelle sur son chromosome W. Le parent femelle de PMSL et le parent mâle de MDPSY sont hybridés et la population recombinante qui en résulte est élevée en trois répétitions dans les conditions habituelles d'élevage d'après Krishnaswamy (1978). Dans la génération F1, toutes les femelles montrent des marquages larvaires sur la surface dorsale de leurs corps et les mâles sont exempts de marquage larvaire. Les femelles F1 sélectionnées sont croisées en retour (BC) avec les mâles MDPSY et on procède à la sélection en conservant les traits désirés du parent récurrent. On continue le croisement de retour récurrent jusqu'à ce que l'on obtienne les traits désirés du parent récurrent et les marquages larvaires du parent donneur. On arrête le croisement de retour à la 4^{ème} génération puisque la lignée devient presque isogénique avec le parent récurrent, en incorporant les marquages larvaires limités au sexe du parent donneur spécifiques à la femelle. On continue les croisements consanguins jusqu'à 8 générations dans chaque ponte pour fixer les traits désirés comme on le voit dans le diagramme. A tous les stades du lignage, on enregistre et on analyse les paramètres quantitatifs importants chez les mâles et les femelles, c'est à dire la fécondité, le *sexe ratio*, la durée larvaire, le rendement en cocons, le taux de nymphose, le poids du cocon, le poids de la coque soyeuse et la richesse soyeuse (Tableau I).

A la huitième génération, pour étudier la performance hybride, la nouvelle souche limitée au sexe SLSY (Fig. 3) est croisée avec trois races bivoltines de référence différentes (SPC, TR et NB4D2) et les pontes saines F1 qui en résultent sont élevées dans les conditions d'élevage habituelles en trois répétitions avec l'hybride témoin, PM × NB4D2. On calcule la performance hybride moyenne, l'hétérosis médiane et meilleure des parents (Tableau II) pour neuf traits quantitatifs importants, c'est à dire la fécondité, la durée larvaire du 5^{ème} âge, la durée larvaire totale, le rendement en cocons / 10 000 larves en nombre et en poids, le taux de nymphose, le poids d'un cocon, le poids de la coque soyeuse et la richesse soyeuse du cocon (%). On calcule aussi l'indice d'évaluation moyen sur la base de leur performance pour les neuf caractères ci-dessus (Tableau III).

RESULTATS ET DISCUSSION

Tanaka (1916) a observé que les chromosomes sexuels chez le ver à soie sont ZZ chez le mâle et ZW chez la femelle. Les vers à soie mâles sont homogamétiques puisqu'ils ne produisent qu'un seul type (Z) de gamètes et les femelles sont hétérogamétiques puisqu'elles produisent à la fois des ovules de type Z et W. Chez le ver à soie de nombreux gènes contrôlant les caractères morphologiques et quantitatifs sont situés sur les chromosomes Z mais on ne trouve pas de gènes pour les caractères quantitatifs sur le chromosome W. Cependant, Hasimoto (1933) a montré que le chromosome W détermine le caractère du sexe femelle.

En 1941, Tazima a transloqué avec succès un gène de marquage larvaire (+^P) du 2^{ème} chromosome au chromosome W par la méthode d'irradiation aux rayons X. Plus tard, Tazima (1951), Tazima et coll., (1951) ont transloqué le gène dominant de la couleur de l'œuf (+^W₂) du 10^{ème} chromosome au chromosome W. Hasimoto (1948), Kimura et coll., (1971) ont mis au point des marquages larvaires zébrés spécifiques au sexe et des souches à cocon coloré. Au Japon, à partir de 1970, des souches limitées au sexe ont été entièrement exploitées. Cinquante pour-cent des hybrides élevés au Japon proviennent de souches limitées au sexe parce qu'ils sont faciles à manipuler (Mano, 1984). De plus, on peut préparer un vrai hybride (croisement d'une femelle polyvoltine vierge avec un mâle bivoltin) en adoptant des souches limitées au sexe, ce qui n'est pas possible avec la méthode conventionnelle de séparation des sexes, où il existe une possibilité d'auto-accouplement. Bien que l'Inde soit le deuxième plus grand producteur de soie au monde, il n'y a que quelques souches limitées au sexe qui ont été mises au point (Sengupta, 1968 et Nagaraju et coll., 1990) et leur usage pratique est limité. Dans cette expérience, en tenant compte du besoin en souches limitées au sexe, on a mis au point une souche de ver à soie limitée au sexe SLSY qui porte des marquages larvaires spécifiques à la femelle (masque, croissants et stars (ECS)) sur la surface dorsale du corps en utilisant la souche PMSL comme parent donneur. Le caractère a été introgressé par la méthode de croisement de retour récurrent, qui est la plus efficace et aussi la plus largement utilisée pour l'amélioration des plantes de culture et des animaux. La performance de la nouvelle souche limitée au sexe aux différentes générations de lignage est présentée dans le Tableau I. Les résultats indiquent que quand on la compare au parent donneur PMSL, il y a une augmentation significative des caractères quantitatifs, qui comprennent la fécondité, la durée larvaire, le poids larvaire, le taux de nymphose, le rendement en cocons, le poids du cocon, le rapport poids du cocon / poids de la coque et la richesse soyeuse du cocon chez SLSY. Dans l'ensemble, on trouve que la durée larvaire totale de la nouvelle souche est inférieure de plus de 30 heures par rapport au parent donneur. Certains sélectionneurs croient que la mortalité femelle est plus élevée chez les souches limitées au sexe parce que les femelles sont hétérogamétiques (ZW) et cela pourrait être dû à des gènes létaux ou sublétaux hémizygotes situés sur le chromosome Z. Chez la souche limitée au sexe SLSY, la mortalité larvaire femelle ne s'avère pas plus élevée que chez les mâles. La viabilité mâle et femelle est comprise dans la même fourchette que chez les autres hybrides.

On a étudié la performance hybride de SLSY en utilisant trois races de référence bivoltines SPC, TR et NB4D2. La performance des combinaisons hybrides de SLSY s'avère meilleure, quand on la compare à celle de l'hybride témoin (PM × NB4D2). On remarque une amélioration significative pour la performance générale et pour l'hétérosis médiane et meilleure du parent pour de nombreux caractères quantitatifs. La performance de la génération F1 et les valeurs pour l'hétérosis médiane et meilleure du parent sont présentées dans le Tableau II. On enregistre une grande part d'hétérosis pour tous les paramètres sauf pour la fécondité, qui s'avère négative parce que dans les combinaisons hybrides, une souche polyvoltine est toujours prise comme parent femelle et une souche bivoltine comme parent mâle. On enregistre l'hétérosis médiane maximum du parent (MPH) pour le rendement en cocons en poids (23-30 %) suivi par le poids du cocon (17 - 28 %) et le poids de la coque (19 - 26 %) bien qu'il soit élevé chez le témoin. Dans le cas de la durée larvaire (5^{ème} âge et durée larvaire totale) bien que l'hétérosis enregistrée (MPH) soit modérée la différence totale (diminution de la durée

larvaire de 40 heures) est très significative d'un point de vue pratique pour les sériciculteurs. De même, le gain de 5 % en richesse soyeuse augmente aussi la récupération de soie de manière importante chez la combinaison SLSY $\times$ SPC.

Les combinaisons SLSY expriment une hétérosis meilleure du parent (BPH) positive pour la durée larvaire totale, le rendement en cocons en nombre, le rendement en cocons en poids et le taux de nymphose, ce qui montre que ces lignées croisées ont de meilleures performances que leurs parents bivoltins. D'autre part, l'hybride témoin (PM $\times$ NB₄D₂) exprime une BPH négative pour la plupart des caractères sauf pour le rendement en cocons en poids. La performance moyenne des quatre combinaisons hybrides, ainsi que l'écart type et la différence critique (CD) obtenus à partir de l'ANOVA et de l'indice d'évaluation moyen (E_I) sont présentés dans le Tableau III. On calcule l'indice d'évaluation moyen en utilisant la méthode d'indice à caractères multiples (Mano et coll., 1992). La combinaison SLSY $\times$ SPC donne la meilleure performance pour sept caractères sur neuf étudiés. Bien que les deux caractères qui restent, le rendement en poids et le poids d'un cocon soient meilleurs chez le croisement SLSY $\times$ NB₄D₂, la valeur pour l'indice d'évaluation générale de SLSY $\times$ SPC est plus élevée en raison de la supériorité des autres traits quantitatifs. L'ANOVA présente une différence significative pour tous les caractères sauf pour le taux de nymphose. Cependant, le taux de nymphose de SLSY $\times$ SPC s'avère plus élevé que chez le témoin. SLSY $\times$ SPC, SLSY $\times$ TR présentent une durée larvaire plus courte de 2 jours, ce qui est un facteur très bénéfique pour les fermiers parce qu'il diminue la consommation de feuilles de mûrier, l'exposition larvaire aux pathogènes et le coût de la main d'œuvre. On ne calcule pas l'analyse de variance pour la durée larvaire en raison de valeurs répétées statiques pour chaque combinaison hybride. L'indice d'évaluation moyen indique que les combinaisons SLSY sont supérieures à l'hybride témoin. La combinaison SLSY $\times$ SPC se classe la première pour la performance (E. I. = 55,39) suivie par SLSY $\times$ NB₄D₂ (E. I. = 53,63) et SLSY $\times$ TR (E. I. = 51,16). Cette étude indique clairement que la nouvelle souche limitée au sexe SLSY mise au point s'avère prometteuse avec une bonne capacité de combinaison, de bons caractères quantitatifs et qualitatifs et une durée larvaire plus courte. On pourrait donc utiliser efficacement et sans risque cette souche limitée au sexe pour la préparation de pontes crossbreed de ver à soie pour l'exploitation commerciale, ce qui permettrait d'économiser beaucoup de main-d'œuvre, d'argent et de temps dans les opérations de grainage à grande échelle.

ISOLATION AND ELECTROFUSION OF INTERSPECIFIC MULBERRY PROTOPLASTS

P. K. TEWARY* & S. OKA**

Plant Biotechnology Department, National Institute of Agrobiological Sciences, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8802, Japan.

Protoplasts were isolated from cotyledon of Morus indica var. S-36 and multiple bud body (MBB) of M. alba var. kenmochi by using optimum enzyme concentrations of Cellulase (2.0%), Macerozyme (1.0%) and Pectolyase (0.05%) for different incubation period. Fusion of these protoplasts was achieved (heterokaryon formation about 60%) by standardizing the conditions of electrofusion and manipulating the concentration of fusion mixture, frequency of current and Pulse width.

Keywords : Protoplast, cotyledon, MBB, protoplast fusion, heterokaryon.

INTRODUCTION

Mulberry, the chief plant in sericulture industry is represented by more than thousands wild and cultivated varieties. The desirable traits of wild varieties such as biotic and abiotic stress tolerance, hardiness etc. are required to be exploited for production of novel mulberry genotypes. Due to inconsistent sex expression and high heterozygosity in mulberry, it is often difficult to hybridize such parents through conventional breeding technique. Protoplast fusion technique can overcome the barrier by hybridizing these parents at somatic level and develop somatic hybrids. Protoplast fusion has been achieved in several plant species. A few successful attempts have been made in mulberry by Katagiri (1988), Tewary and Lakhmisita (1992), Ming *et al.* (1992), Tohjima *et al.* (1996),

Chand *et al.*, (1996) tried to isolate the viable protoplasts from mesophyll and callus cultures, however, somatic hybrids could not be regenerated from fused protoplasts. Protoplast fusion involving mulberry and paper mulberry protoplasts has also been attempted by Ohnishi *et al.*, (1989) and Ohnishi & Tanabe (1989). In spite of these attempts much reproducible results have not been obtained in mulberry, hence further investigation is needed in this aspect.

Under the present investigation attempts have been made to isolate protoplasts from two different mulberry species i.e., *Morus indica* & *M.alba* and to optimize the conditions of electrofusion of protoplasts.

MATERIALS AND METHODS

Protoplast isolation from cotyledon:

Open pollinated seeds collected from *Morus indica* var. S-36 were cultured on MS (Murashige and Skoog, 1962) basal medium containing 3% sucrose + 0.8% agar. The cotyledons excised from 8-10 days old seedlings were cut into fine stripes of about 1 mm size and incubated in 10 ml of filtrate-

* Regional Sericultural Research Station, Central Silk Board, Hehal, Ranchi-834005, India.

** Author for correspondence.

sterilized (0.45 μ m filtre) enzyme solution containing Cellulase Onozuka R10, Cellulase Onozuka RS, Macerozyme R10, Meicelase P1 and Pectolyase Y23 in CPW (Cocking and Peberdy, 1974) medium supplemented with 9% mannitol (pH 5.8) for 5 - 13 hours at stationary or rotary (60 rpm) condition under dark or in light. After incubation, enzyme solution containing digested tissue was filtered through miracloth in a 50 ml conical flask. Filtrate was transferred to sterilized screw cap tube and centrifuged at 800 rpm for 5 min. Supernatant was pipetted out and the pellet was loaded on 21% sucrose solution (prepared in CPW medium) in order to purify the protoplast. The tube was centrifuged at 1000 rpm for 8 min. A band containing protoplasts appeared at the top of the sucrose solution which was collected and transferred to fresh tube containing 5 ml of washing medium (CPW medium + 9% mannitol). Tube was spinned at 800 rpm for 4 min. Supernatant was pipetted out and the pellet was washed with 5 ml of washing medium by repeating the process two more times. Thereafter, the pellet was suspended in 1 ml of CPW medium and protoplast yield was calculated with the help of haemocytometer.

Protoplast isolation from MBB:

Protoplasts were isolated from Multiple Bud Body (MBB) of *M. alba* var. kenmochi (developed from shoot apex culture, Oka 1995 maintained in liquid MS medium + 4PU (2 mg/l) by periodical subculturing at 14 days interval under rotary condition (120 rpm, 16-h photoperiod, 25° C). MBB were chopped into pieces, incubated in enzyme solution, filtered through miracloth and the filtrate was centrifuged at 800 rpm for 8 min as mentioned above. The pellet was washed in 5 ml of CPW + 9% mannitol (washing medium) at 800 rpm for 5 min. Washing process was repeated two times following same centrifugation. Finally, the washed protoplast suspension (about 1 ml) was loaded on 8 ml of 21% sucrose solution prepared in CPW salts in a fresh tube and spinned at 1000 rpm for 8 min. Protoplast band which appeared at the top of the sucrose solution was collected and suspended in 1 ml of CPW medium. Protoplast yield was calculated with the help of haemocytometer.

Viability test of isolated protoplasts:

Protoplast viability was tested using Fluorescein diacetate (FDA) staining technique. 50 μ l of FDA solution (Stock solution consisting 0.05% FDA in acetone) was added in 75 μ l of water and then one drop of stain was mixed with one drop of protoplast suspension in a cavity slide. Protoplasts were allowed to stain for 5 min and then observed under UV microscope.

Electrofusion of protoplasts:

Using protoplasts of *M.alba* var. kenmochi and of *M.indica* var.S-36, electrofusion was tried using an Electric Fusion Processor (Shimazu SSHI).

After isolation, protoplasts from both the explants were first diluted to 5×10^5 / ml density by adding sterilized fusion medium and then equal quantity of both the protoplast suspensions were mixed in a screw cap tube. The fusion medium consisting of aqueous solution of 9% mannitol + CaCl₂ either at 0.1mM, 0.5mM and 1.0mM concentration was used. Mixed protoplast suspension (about 1 ml), thereafter, was pored in fusion chamber (0.3 mm width) and AC current was run. Prior to run AC current, Fusion processor was set either at 0.5 - 1 Mhz frequency, 200 - 400 μ s PW and 200 - 400 V VDC. After forming a chain of mixed protoplasts (MBB and cotyledon), DC pulse was given 6-8 times and protoplasts were allowed to fuse. A few minutes later again 3-4 pulses were given and the fused protoplasts were allowed to settle for 10-15 min in fusion chamber itself.

After fusion protoplast suspension was transferred to sterile 40 mm Petri dishes containing 3 ml of KM8P (Kao and Michayluk, 1974) culture medium + 9% mannitol supplemented with different combinations of growth regulators i. e. BAP (0.5-2.0 mg/l), 4PU (0.5-2.0 mg/l), NAA(1.0 mg/l), 2,4-D(0.25 mg/l). Cultures were maintained at 25° C under dark.

RESULTS AND DISCUSSION

Protoplast yield and viability:

The data summarised in Table I & II reveal that in case of cotyledon and MBB explants the enzyme solution containing a combination of 2.0% Cellulase R10, 1.0% Macerozyme R10 and 0.05% Pectolyase Y23 yielded maximum protoplasts ($3.0 \times 10^5/\text{ml}$, $4.6 \times 10^5/\text{ml}$ respectively) for 5 hrs and 13 hrs incubation at 60 rpm under dark respectively (Fig. 1A, B).

Table I. Protoplast yield obtained from cotyledon explants of *Morus indica* var. S-36 seedlings.

Tableau I. Rendement en protoplastes obtenus à partir d'explants de cotylédons de jeunes plants de Morus indica var. S-36.

Sl. No.	Enzyme concentration in CPW medium + 9% mannitol (incubation period)	Protoplast yield / ml	Viability (%)
No. de Série	Concentration en enzymes dans le milieu CPW + 9 % mannitol (durée d'incubation)	Rendement en protoplastes / ml	Viabilité (%)
1.	Cellulase RS 3.0% + Macerozyme 1.0%+ Meicelase 1.0% + Pectolyase 0.1% (1hr, 60rpm + 4 hrs, static in light) (1 hr, 60 tpm + 4 hrs statique à la lumière)	1.0×10^5	75.4
2.	Cellulase R10 2.0% + Macerozyme 0.5% + Pectolyase 0.05% (7 hrs, 60rpm in dark) / (7 hrs, 60 tpm dans l'obscurité)	1.7×10^5	72.5
3.	Cellulase R10 2.0% + Macerozyme 0.5% + Pectolyase 0.05% (13 hrs, 60rpm in dark) / (13 hrs, 60 tpm dans l'obscurité)	5.5×10^4	41.5
4.	Cellulase R10 2.0% + Macerozyme 1.0% + Pectolyase 0.05% (5 hrs, 60 rpm in dark) / (5 hrs, 60 tpm dans l'obscurité)	3.0×10^5	77.2

Cellulase R10 was found giving better protoplast yield than Cellulase RS. Cellulase R10 at 2.0% concentration was optimum in both the explants tested. Macerozyme R10 ranging from 0.5%-1.0% was found essential to realise the yield. When Macerozyme concentration was increased from 0.5% to 1.0%, it reduced the incubation period from 13 hrs to 5 hrs in case of cotyledon explants. For MBB protoplasts, 0.5% and 1.0% concentrations of Macerozyme were found optimum at 12 and 13 hrs incubation, respectively. Addition of Pectolyase Y23 at low concentration of 0.05% was found playing an important role in fetching higher protoplast yield in both the explants.

Table II. Protoplast yield obtained from MBB of *Morus alba* var. kenmochi.**Tableau II. Rendement en protoplastes obtenus à partir de MBB de la var. kenmochi de *Morus alba*.**

Sl. No.	Enzyme concentration in CPW medium + 9% mannitol (incubation period)	Protoplast yield / ml	Viability (%)
No. de Série	Concentration en enzymes dans le milieu CPW + 9 % mannitol (période d'incubation)	Rendement en protoplastes / ml	Viabilité (%)
1.	Cellulase R10 2.0% + Macerozyme 1.0% (7 hrs, 60 rpm in dark) (7 hrs, 60 tpm dans l'obscurité)	3.0×10^5	80.5
2.	Cellulase R10 2.0% + Macerozyme 1.0% (13 hrs, 60 rpm in dark) (13 hrs, 60 tpm dans l'obscurité)	3.5×10^5	71.2
3.	Cellulase R10 2.0% + Macerozyme 1.0%+ Pectolyase 0.05% (13 hrs, 60 rpm in dark) (13 hrs, 60 tpm dans l'obscurité)	4.6×10^5	75.6
4.	Cellulase RS 3.0% + Macerozyme 1.0%+ Meicelase 1.0% + Pectolyase 0.1% (1 hr, 60 rpm + 4 hrs static in light) (1 hr, 60 tpm + 4 hrs statique à la lumière)	1.1×10^5	78.0

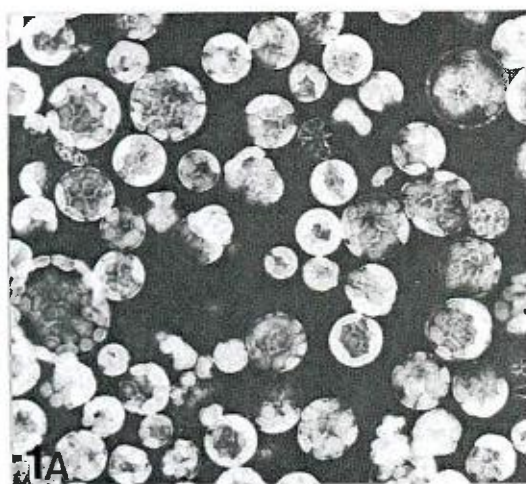


Fig.1 A. Freshly isolated protoplasts from cotyledons of 9 days - old *Morus indica* var. S-36 seedlings using enzyme mixture of Cellulase-R10 (2.0%)+ Macerozyme-R10 (1.0%)+ Pectolyase-Y23 (0.05%) (400 ×).

Fig. 1 A. Protoplastes fraîchement isolés de cotylédons de jeunes plants de 9 jours de la var. S-36 de *Morus indica* en utilisant un mélange enzymatique de cellulase-R10 (2 %) + Macérozyme-R10 (1,0 %) + Pectolyase-Y23 (0,05 %) (400 ×).

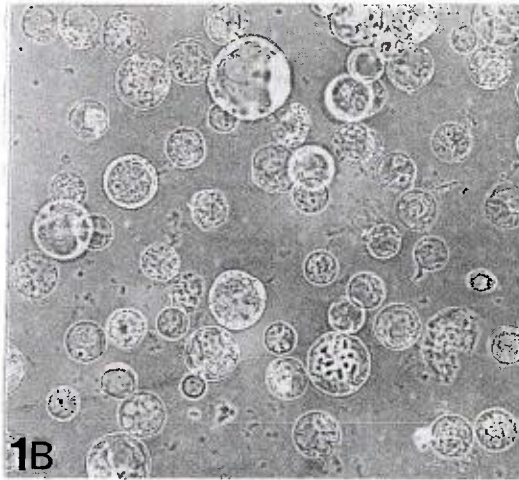


Fig. 1 B. Freshly isolated protoplasts from 13 days-old MBB of *Morus alba* var. kenmochi using enzyme mixture of Cellulase-R10 (2.0%)+ Macerozyme-R10 (1.0%)+ Pectolyase-Y23 (0.05%) (400 ×).

Fig. 1 B. Protoplastes fraîchement isolés de MBB de 13 jours de Morus alba var. kenmochi en utilisant un mélange enzymatique de Cellulase-R10 (2 %) + Macérozyme-R10 (1.0%) + Pectolyase-Y23 (0,05 %) (400 ×).

As far as the incubation condition was concerned rotary condition (60 rpm) under dark was found more desirable than the stationary one. As MBB protoplast consists of vacuole and are light in weight compared to cotyledon protoplasts, the isolation process was changed in this case to minimise the loss of yield. Purification of protoplasts was done (by loading on 21% sucrose solution) as a last step in isolation procedure.

Viability of the protoplasts was tested through FDA staining. It differed depending on enzyme concentrations and incubation periods used. Although viability ranged from 40% to 80%, it was noticed that in general 70% protoplasts remained viable when optimum cultural conditions were maintained.

Standardization of conditions for electrofusion:

In order to achieve successful protoplast fusion the following parameters pertaining to fusion technique were standardized:

1. Concentration of Calcium chloride in fusion medium.
2. Density of protoplast in mixed protoplast suspension.
3. Frequency (Mhz), Voltage (VDC), Pulse Width (PW) of electric current in Fusion processor.

At 0.1 mM CaCl_2 concentration, 2-5 protoplasts formed chain within 5-10 sec and the chains started moving towards the edge of the groove in which protoplast suspension was pored (Fig.2). When the current was continued, chain became long consisting 20-30 protoplasts. In case of 0.5 mM CaCl_2 concentration, chains of 5-10 protoplasts were formed in the beginning, which subsequently became too long consisting 50-80 protoplasts. In case of 1.0 mM CaCl_2 , within 2-5 sec of AC current running, chains of 15-20 protoplasts were formed and within a minute chain became as long consisting 80-100 protoplasts which subsequently thickened by joining 2 or 3 such chains together (Fig.3). It was therefore concluded that CaCl_2 at 0.1 mM concentration in culture medium was optimum for fusion.

Protoplast density was found as an important factor in forming suitable protoplast chain. Keeping all the above factors constant when protoplast suspension of 10^6 /ml density was used, long chain consisting 8-10 protoplasts were formed within 5 sec whereas when a low protoplast density of 3-5

$\times 10^5/\text{ml}$ was used it formed smaller chains of 2-3-5 protoplasts. Hence, low protoplast density was found desirable.

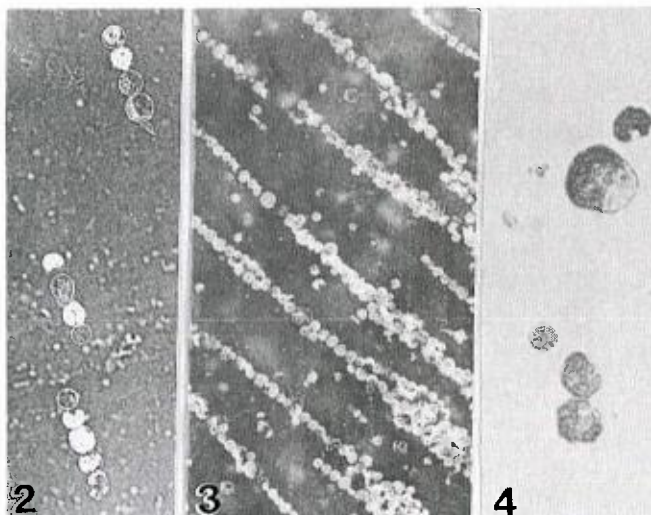


Fig. 2. Formation of short chains consisting protoplasts of cotyledon and MBB explants (150 $\times$).

Fig. 2. Formation de courtes chaînes constituées de protoplastes de cotylédon et d'explants MBB (150 $\times$).

Fig. 3. Formation of long chains consisting protoplasts of cotyledon and MBB explants (50 $\times$).

Fig. 3. Formation de longues chaînes constituées de protoplastes de cotylédon et d'explants MBB (50 $\times$).

Fig. 4. Formation of heterokaryon after fusing protoplast of *M.indica* and *M. alba* (400 $\times$).

*Fig. 4. Formation d'hétérokaryons après la fusion de protoplastes de *M. indica* et de *M. alba* (400 $\times$).*

By using 2 different intensity of frequency (0.5 Mhz, 1Mhz) and VDC (200 V, 400 V) and 3 different Pulse Width (100 μ s, 200 μ s, 400 μ s) with a constant alignment of 40 Volt, it was observed that when the frequency of 0.5 Mhz, Pulse Width of 400 μ s and VDC of 400 V was used, about 60% protoplast fusion was achieved. The fusion was monitored through microscopic observation. The resultant heterokaryons were found intact (Fig.4), free floating and displayed a high percentage of viability (about 60%). The cultural conditions tested under present investigation were not find responsive to the growth of heterokaryon leading to plant regeneration, hence further investigation is required to develop suitable medium for regeneration.

ACKNOWLEDGEMENT

We are thankful to Dr.A.Sarkar, Joint Director, Central Sericultural Research Institute, Mysore for his valuable suggestions and guidance in preparation of manuscript.

REFERENCES

- CHAND P.K., SAHOO Y., PATTANAIK S.K., PATNAIK S.N.(1996) Evaluation of procedures for interspecific protoplast fusion in mulberry. Ind. Jour. Seric., 35(1), 46-49.
 COCKING E.C., PEBERDY J.F. (1974) The use of plant protoplasts from fungi and higher plants as genetic systems. A Practical HandBook, University of Nottingham.
 KAO N.K., MICHAYLUK M.R. (1974) A method for high frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. Planta, 115, 355 - 367.

- KATAGIRI K. (1988) Specific and cultural differences in division of cells in culture of mulberry mesophyll protoplasts. J.Seric. Sci. Jpn., 54, 445-446.
- MING W.Z., XU Z.H., XU V., REN H.M. (1992) Plant regeneration from leaf mesophyll protoplasts of *Morus alba*. Pl. Physiol. Commu., 28, 248-249.
- MURASHIGE T., SKOOG F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 15, 473-497.
- OHNISHI T., SHIBAYAMA K., TANABE H. (1989) On the protoplast fusion of mulberry and paper mulberry in polyethylene glycol. J. Seric. Sci. Jpn., 58(2), 145-149.
- OHNISHI T., TANABE H. (1989) On the protoplast fusion of mulberry and paper mulberry by electrofusion method. J. Seric. Sci. Jpn., 58(4), 353-354.
- OKA S. (1995) Micropropagation of mulberry (*Morus alba* L.) by liquid -shake culture of multiple bud bodies. Combined Proceedings International Plant Propagators Society, 45, 661-664.
- TEWARY P.K., LAKSHMISITA G. (1992) Protoplast isolation, purification and culture in mulberry (*Morus* spp.). Sericologia, 32(4), 651-657.
- TOHJIMA F., YAMANOUCHI H., KOYAMA A., MACHII H. (1996) Effects of various enzymes on the efficiency of protoplast isolation from mulberry mesophylls. J.Seric. Sci. Jpn. 65 (6): 485-489.

ISOLEMENT ET ELECTROFUSION INTERSPECIFIQUE DE PROTOPLASTES CHEZ LE MURIER

P. K. TEWARY* & S. OKA**

Plant Biotechnology Department, National Institute of Agrobiological Sciences, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8802, Japon.

*On a isolé les protoplastes du cotylédon de la var. S-36 de **Morus indica** et de bourgeons multiples (MBB) de la var. kenmochi de **M. alba** en utilisant des concentrations optimum de cellulase (2 %), de macérozyme (1 %) et de pectolyase (0,05 %) pendant différentes périodes d'incubation. On a réussi la fusion de ces protoplastes (environ 60 % de formation d'hétérocaryons) en standardisant les conditions de l'électrofusion et en manipulant la concentration du mélange de fusion, la fréquence du courant et la fenêtre d'impulsion.*

INTRODUCTION

Le mûrier, la plante principale de l'industrie séricicole est représenté par des milliers de variétés cultivées et sauvages. On a besoin d'exploiter les caractères désirables des variétés sauvages tels que la tolérance aux stress biotique et abiotique et la résistance pour la production de nouveaux génotypes de mûriers. Il est souvent difficile d'hybrider de tels parents par la technique de lignage conventionnelle en raison de l'expression sexuelle inconsistante et de l'hétérozygotie importante du mûrier. La technique de fusion des protoplastes permet de surmonter cette barrière en hybridant ces parents au niveau somatique pour mettre au point des hybrides somatiques. On a réussi la fusion des protoplastes chez plusieurs espèces de plantes. Katagiri (1988), Tewary et Lakhmisita (1992), Ming et coll., (1992), Tohjima et coll., (1996) ont obtenu certaines réussites chez le mûrier.

Chand et coll., (1996) ont essayé d'isoler des protoplastes viables à partir de cultures du mésophylle et du cal, cependant, on n'a pas pu régénérer des hybrides somatiques à partir des protoplastes fusionnés. Onishi et coll., (1989) et Ohnishi & Tanabe (1989) ont aussi essayé la fusion des protoplastes du mûrier et du mûrier papier. Malgré ces essais, on n'a pas obtenu de résultats reproductibles chez le mûrier, on a donc besoin de recherches supplémentaires dans ce domaine.

Dans notre recherche, nous avons essayé d'isoler les protoplastes de deux espèces de mûrier différentes, *Morus indica* et *M. alba* et d'optimiser les conditions d'électrofusion des protoplastes.

MATERIELS ET METHODES

Isolement des protoplastes du cotylédon :

On cultive des graines pollinisées librement de la var. S36 de *Morus indica* sur un milieu de base MS (Murashige et Skoog, 1962) contenant 3 % de saccharose + 0,8 % d'agar. On coupe les cotylédons, retirés sur des plantules de 8 à 10 jours, en bandes fines d'environ 1 mm et on les incube dans 10 ml de solution d'enzyme filtrée et stérilisée (filtre de 0,45 µm) contenant de la Cellulase

* Regional Sericultural Research Station, Central Silk Board, Hehal, Ranchi – 834 005, Inde.

**Auteur auquel adresser la correspondance.

Onozuka R10, de la Cellulase Onozuka RS, de la Macérozyme R10, de la Meicelase P1 et de la Pectolyase Y23 dans du milieu de CPW (Cocking et Peberdy, 1974) additionné de mannitol à 9 % (pH de 5.8) pendant 5 à 13 heures dans des conditions stationnaires ou de rotation (60 tpm) à l'obscurité ou à la lumière. Après incubation, la solution enzymatique contenant les tissus digérés est filtrée au travers d'un tissu dans une flasque conique de 50 ml. Le filtrat est transféré dans un tube stérilisé à bouchon vissé et est centrifugé à 800 tpm pendant 5 min. On pipette le surnageant et on dépose le culot sur une solution de saccharose à 21 % (préparée dans du milieu CPW) pour purifier les protoplastes. Le tube est centrifugé à 1000 tpm pendant 8 min. Une bande contenant les protoplastes apparaît au sommet de la solution de saccharose que l'on recueille et que l'on transfère dans un tube propre contenant 5 ml de milieu de lavage (milieu CPW + 9 % de mannitol). On fait tourner le tube à 800 tpm pendant 4 min. On pipette le surnageant et on lave le culot avec 5 ml de milieu de lavage en répétant le processus deux nouvelles fois. Puis, le culot est suspendu dans 1 ml de milieu CPW et on calcule le rendement en protoplastes à l'aide d'un hémocytomètre.

Isolement des protoplastes de MBB :

On isole les protoplastes des corps de bourgeons multiples (MBB) de la var. kenmochi de *M. alba* [obtenus à partir de cultures du sommet de la tige, (Oka 1995) maintenus dans du milieu MS liquide + 4PU (2mg/l) grâce à des sous-cultures périodiques à 14 jours d'intervalle dans des conditions de rotation (120 tpm, photopériode de 16 h, 25° C)]. On coupe les MBB en morceaux, on les incube dans une solution d'enzymes, que l'on filtre à travers un tissu et on centrifuge le filtrat à 800 tpm pendant 8 min comme mentionné plus haut. On lave le culot dans 5 ml de CPW + 9 % de mannitol (milieu de lavage) à 800 tpm pendant 5 min. On répète le processus de lavage deux fois en effectuant la même centrifugation. Finalement, on charge la suspension de protoplastes lavés (environ 1 ml) sur 8 ml de solution de saccharose à 21 % préparée dans des sels de CPW dans un tube propre qu'on fait tourner à 1000 tpm pendant 8 min. On recueille la bande de protoplastes qui apparaît au sommet de la solution de saccharose et on la suspend dans 1 ml de milieu CPW. On calcule le rendement en protoplastes à l'aide d'un hémocytomètre.

Test de viabilité des protoplastes isolés :

On teste la viabilité des protoplastes en utilisant la technique de coloration au diacétate de fluorescéine (FDA). On ajoute 50 µl de solution FDA (solution mère consistant en 0,05 % de FDA dans de l'acétone) dans 75 µl d'eau et puis on mélange une goutte de colorant avec une goutte de suspension de protoplastes dans la cavité d'une lame. On laisse les protoplastes se colorer pendant 5 min et on les observe sous un microscope UV.

Electrofusion des protoplastes :

On essaie l'électrofusion des protoplastes de la var. kenmochi de *M. alba* et de la var S-36 de *M. indica* en utilisant un transformateur à fusion électrique (Shimazu SSHI).

Après l'isolement, on dilue les protoplastes des deux explants d'abord à une densité de 5×10^5 / ml en ajoutant un milieu de fusion stérilisé et puis une quantité égale des deux suspensions de protoplastes est mélangée dans un tube à bouchon vissé. On utilise un milieu de fusion constitué d'une solution aqueuse de mannitol à 9 % + CaCl₂ à une concentration de 0,1 mM, 0,5 mM et de 1,0 mM. Puis, la suspension des protoplastes mélangés (environ 1 ml) est versée dans la chambre de fusion (largeur de 0,3 mm) et on applique du courant alternatif. Avant de brancher le courant alternatif, on ajuste le processeur de fusion à une fréquence de 0,5 – 1 Mhz, 200-400 µs PW et 200-400 V de VDC. Après la formation d'une chaîne de protoplastes mélangés (MBB et cotylédons), on donne 6 à 8 impulsions de courant continu et on laisse les protoplastes fusionner. Quelques minutes plus tard, on donne à nouveau 3 à 4 impulsions et on laisse les protoplastes reposer pendant 10 à 15 minutes dans la chambre de fusion.

Après la fusion, on transfère la suspension de protoplastes dans des boîtes de Petri stériles de 40 mm contenant 3 ml de milieu de culture KM8P (Kao et Michayluk, 1974) + 9 % de mannitol additionné avec des combinaisons différentes de régulateurs de croissance, c'est à dire du BAP (0,5 – 2 mg / l), du 4 PU (0,5 – 2 mg / l), du NAA (1,0 mg / l), du 2,4-D (0,25 mg / l). Les cultures sont conservées à 25° C dans l'obscurité.

RESULTATS ET DISCUSSION

Rendement et viabilité des protoplastes :

Les données résumées dans les Tableaux I & II révèlent qu'avec des explants de cotylédons et de MBB, la solution d'enzymes contenant une combinaison de 2 % de cellulase R10, 1 % de macérozyme R10 et 0,05 % de Pectolyase Y23 donne le maximum de protoplastes (respectivement $3,0 \times 10^5$ / ml, $4,6 \times 10^5$ / ml) pour une incubation de respectivement 5 hrs et de 13 hrs à 60 tpm à l'obscurité (Fig. 1A, B).

On trouve que la cellulase R10 donne un meilleur rendement en protoplastes que la cellulase RS. La cellulase R10 à une concentration de 2 % est optimum chez les deux explants testés. On trouve que la macérozyme R10 de 0,5 % à 1 % est essentielle pour obtenir un rendement. Quand on augmente la concentration en macérozyme de 0,5 % à 1 %, cela diminue la période d'incubation de 13 hrs à 5 hrs avec les explants de cotylédons. Pour les protoplastes de MBB, on trouve que les concentrations de Macerozyme à 0,5 % et à 1 % sont optimum avec respectivement 12 et 13 heures d'incubation. L'ajout de Pectolyase Y23 à une faible concentration de 0,05 % s'avère jouer un rôle important pour obtenir un rendement en protoplastes plus élevé chez les deux explants.

En ce qui concerne les conditions d'incubation, on trouve que la condition de rotation (60 tpm) à l'obscurité est meilleure que l'état stationnaire. Comme les protoplastes de MBB sont constitués de vacuoles et sont légers en poids par comparaison aux protoplastes du cotylédon, on change le processus d'isolement pour minimiser la perte de rendement. La dernière étape de la procédure d'isolement est la purification des protoplastes (en les déposant sur une solution de saccharose à 21 %). On teste la viabilité des protoplastes grâce à une coloration FDA. Elle diffère en fonction des concentrations d'enzyme et des périodes d'incubation utilisées. Bien que la viabilité soit comprise entre 40 % et 80 %, on remarque en général que 70 % des protoplastes restent viables quand on maintient des conditions de culture idéales.

Standardisation des conditions de l'électrofusion :

Pour obtenir une fusion réussie des protoplastes, nous avons standardisé les paramètres suivants de technique de fusion :

1. concentration en chlorure de calcium dans le milieu de fusion.
2. densité de protoplastes dans la suspension de protoplastes mélangés.
3. fréquence (Mhz), voltage (VDC), fenêtre d'impulsion (PW) du courant électrique.

Avec une concentration en CaCl_2 de 0,1 mM, il se forme une chaîne de 2 à 5 protoplastes en 5 à 10 sec et les chaînes commencent à bouger vers le bord de la rainure dans laquelle on verse la suspension de protoplastes (Fig. 2). Quand on maintient le courant, la chaîne devient longue et est constituée de 20 à 30 protoplastes. Avec une concentration en CaCl_2 de 0,5 mM, il se forme au début des chaînes de 5 à 10 protoplastes, qui par la suite deviennent trop longues et sont constituées de 50 à 80 protoplastes. Avec 1,0mM de CaCl_2 , et en mettant du courant alternatif pendant 2 à 5 sec, il se forme des chaînes de 15 à 20 protoplastes et en une minute, la chaîne devient longue et est constituée de 80 à 100 protoplastes qui par la suite épaississent grâce à la fusion de 2 à 3 chaînes semblables entre elles (Fig. 3). On conclut donc que le CaCl_2 à une concentration de 0,1 mM dans le milieu de culture est optimum pour la fusion.

On trouve que la densité en protoplastes est un facteur important pour une bonne formation d'une chaîne de protoplastes. Si on conserve tous les facteurs ci-dessus constants, en utilisant une suspension

de protoplastes d'une densité de 10^6 / ml, il se forme une longue chaîne de 8 à 10 protoplastes en 5 secondes tandis qu'avec une faible densité de protoplastes de $3 \text{ à } 5 \times 10^5$ / ml, il se forme des chaînes plus petites de 2-3-5 protoplastes. On trouve donc qu'une faible densité de protoplastes est souhaitable.

En utilisant 2 fréquences différentes (0,5 Mhz, 1Mhz), deux voltages (200 V, 400 V) et 3 différentes fenêtres d'impulsion (100 μ s, 200 μ s, 400 μ s) avec un alignement constant de 40Volt, on observe qu'avec une fréquence de 0,5 Mhz, une fenêtre d'impulsion de 400 μ s et 400 V de VDC, on obtient environ 60 % de fusions de protoplastes. On contrôle la fusion par l'observation au microscope. Les hétérocaryons qu'on obtient sont intacts (Fig. 4), flottent librement et présentent un pourcentage élevé de viabilité (environ 60 %). Les conditions de culture testées dans cette étude n'étaient pas favorables à la croissance d'hétérocaryons conduisant à la formation de plantes. Il faudrait donc entreprendre des études supplémentaires pour mettre au point un milieu adapté pour la régénération.

SEASONAL INTENSITY OF STEM BORER *PSILOPTERA FASTUOSA* (COLEOPTERA) INFESTATION ON ARJUNA (*TERMINALIA ARJUNA*) AND ITS CONTROL

P. K. SINGH*, B. D. SINGH & S. K. TIWARI

Central Tasar Research & Training Institute, Research Extension Center, Katghora,
Bilaspur (M. P.), India.

Psiloptera fastuosa is a serious pest of Arjuna, *Terminalia arjuna* which is a primary food plant of tasar silkworm *Antheraea mylitta* D. used for producing tasar silk for commercial exploitation. The grubs of this insect bore into the stem and form tunnels by destroying the xylem and phloem. The infestation of this pest prevails throughout the year in this food plant and reaches its peak during February (41%) with a sudden drop of 22% in March and it reduced to nearly one fourth (9%) in the months of August-September. The plant infestation and physical factors were statistically analysed to understand the effects of these factors on infestation. The correlation co-efficient analysis revealed that the extent of infestation was negatively correlated [$r: -0.3223$] to temperature and positively correlated [$r: +0.7660$] to relative humidity. For controlling this pest plugging of holes with cotton soaked in 0.04% phosphamidon (trade name Dimecron) was found most effective in reducing the infestation to the tune of 96% which was highly significant at $P < 0.001$. Thus, it is recommended for the control of this pest.

Keywords: *Psiloptera fastuosa*, stem borer, seasonal intensity, Dimecron.

INTRODUCTION

The arjuna, *Terminalia arjuna*, plants are predominantly available in the forests of tasar growing districts of Madhya Pradesh i. e. Bastar, Bilaspur, Raigarh, Surguja, Balaghat, Mandla and Jhabua. This is one of the primary food plants of tasar silkworm *Antheraea mylitta* D. The rearers of Madhya Pradesh area use arjuna plants for the rearing of tasar silkworms. They pay a nominal amount of royalty to the forest department and take the permission to utilise the arjuna plants of forests for particular crop. Many pests and predators attack this plant i. e. *Sphenoptera konbierensis* Kerr, *Sternocera orientalis*, *Laspeyresia pseudonectis* Kerr., *Trioza fletcheri* minor, *Phylloptecta hirsuta*, *Megatrioza hirsuta* and *Psiloptera fastuosa* (Dhar *et al.*, 1988). Among all these *Psiloptera fastuosa*, is a serious pest, infesting a wide range of plants including *Terminalia arjuna* and *Terminalia tomentosa*. The grubs of this pest are found to be more destructive than the adults due to their chewing and burrowing type of mouthparts. The presence of grubs could be ascertained by the presence of a gummy substance secreted at the injured portion in the plant and the presence of small pellets of chewed wood mixed with excreta lying on the ground near the stem.

* Present address: Regional Sericultural Research Station Sahaspur Dehradun Uttaranchal (India), to whom correspondence should be addressed.

MATERIALS AND METHODS

The systematic arjuna plantation planted during 1987 was utilized for this experiment. The whole experimental area (1.14 hectare) was divided into 20 blocks. Each block consisted of 200 arjuna plants (1.8m × 1.8 m). The randomised block design was considered for this experiment. All the treatments were replicated thrice with 266 plants per replication and 98 plants were considered for collecting the data by ignoring the guard rows. The infestation percentage of borer was assessed on the basis of the presence of grubs or exit holes on the trees. The seasonal intensity of infestation was recorded monthly by considering the plants randomly throughout the year during 1991. The data on abiotic factors like maximum temperature, minimum temperature and moisture content were also recorded in the same period. These factors were then correlated with extent of infestation by statistical analysis to find out the co-efficient of correlation.

To control the borer infestation, Phosphamidon (trade name, Dimecron) in different concentrations i. e., 0.01%, 0.02%, 0.03%, 0.04% and 0.05% were prepared. The insecticide was applied by plugging the holes with cotton soaked in different concentrations of Dimecron. In control the whole procedure was same except wet cotton soaked with water in place of insecticide was used. The plugging was done with an iron stick of 2 mm diameter by inserting the soaked cotton into the holes. The efficacy of different treatments was determined by recording the number of reappearance of the holes each month in addition to the presence of grubs. The data collected from all the treatments was statistically analysed to find out the best treatment. The mean percentage of mortality was calculated by considering dead grubs divided by the number of live grubs and multiplying it by 100. The mean mortality of replications was calculated by taking simple calculation of mean mortality of replications as per the procedure of Singh and Das (1999).

RESULTS AND DISCUSSION

The data recorded revealed that borer infestation prevails throughout the year and reached its peak during February (40%) with a sudden drop to 22% in March and reduced to nearly one fourth (9%) in August and September (fig. 1). The peaks were closely related to the reproductive cycle of this species and immature forms were dominant during the infestation period. Usher (1976) stressed that cyclic processes are well known in mammals but so far have not been demonstrated in insects. Hence, these findings lend secondary support to the present investigation. Ryke and Loots (1969) established that growth and the preponderance of infestation was associated with fluctuations involving temperature and relative humidity. In the present work the temperature and relative humidity were found negatively correlated ($r = -0.4930$) and positively correlated ($r = 0.7660$) respectively (Table I).

Reports are available regarding the decrease of populations of animals when temperature either rises or falls below a critical level (Dowdy, 1944). In the present study, the population of borer was increased by the increase of relative humidity. Nielsen (1955) also reported that moisture plays a significant role in the increase of the animal population and prolonged drought was seen to have serious effects on the survival of the individuals.

The efficacy of different concentrations of Dimecron was assessed and it was found that all the treated lots showed more than 44% mortality of borer as against 1.36% in control. Dimecron 0.04% showed maximum (96.26 ± 1.00) control over others (Table II).

Control:

This study revealed that all of the treatments have effectiveness above 44% over the control and over 96% control in 0.04% Dimecron. In the control lot above 98% cases were found with the reopening of the holes in the plants. Data presented in Table II show that the treatment applications

were significant over the control and the application of 0.04% phosphamidon was highly significant ($P < 0.01$).

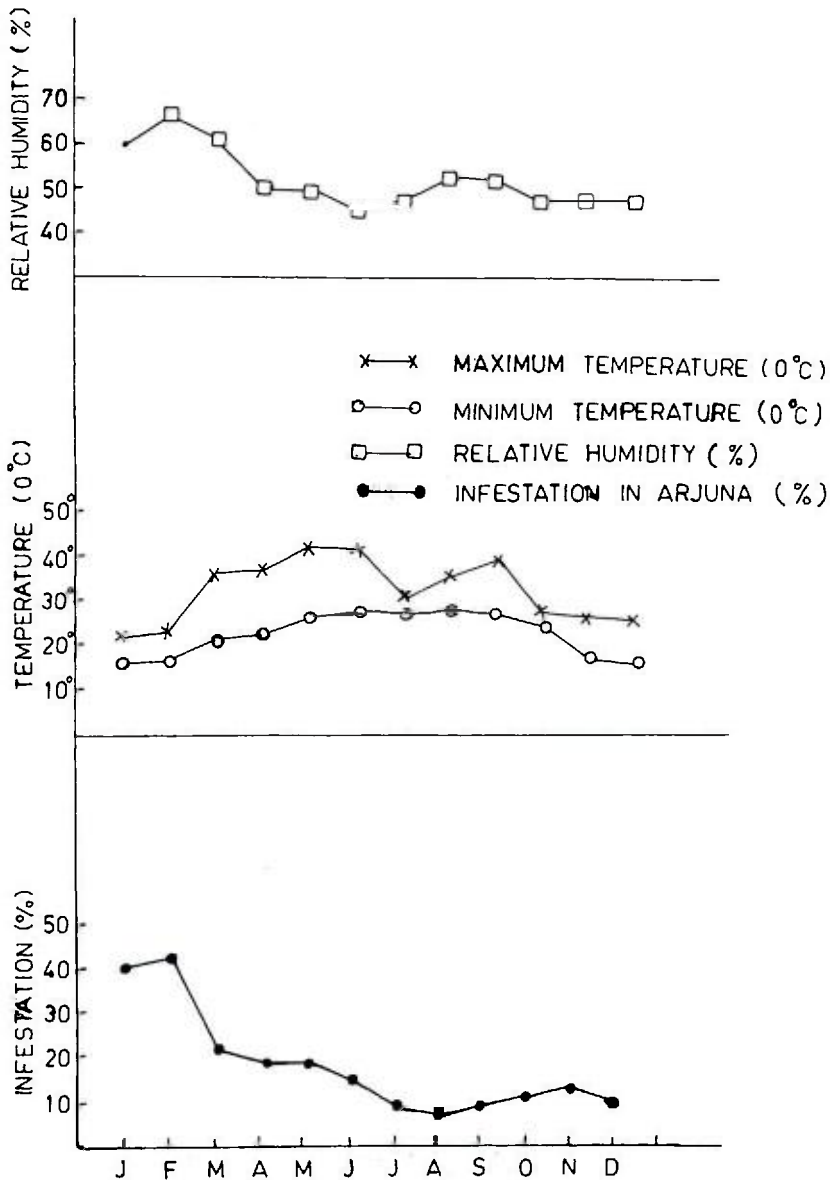


Fig. 1. Monthly infestation fluctuation of *Psiloptera* and related abiotic factors.

*Fig. 1. Fluctuation de l'infestation par *Psiloptera* en fonction du mois et des facteurs abiotiques.*

Table I. Coefficient of correlation between infestation of *Psiloptera fastuosa* and abiotic factor in relation to *T. arjuna* during 1991.

Tableau I. Coefficient de corrélation entre l'infestation de *T. arjuna* par *Psiloptera fastuosa* et les facteurs abiotiques pendant l'année 1991.

Abiotic Factors	No. of observations	dx dy	$\sum x$	$\sum y$	Coefficient of correlations (r)
<i>Facteurs abiotiques</i>	<i>Nbre d'observations</i>				<i>Coefficient de corrélations (r)</i>
Max. temp.	12	-413.849	10.92	7.240	-0.3223 NS
Min. temp.	12	-293.720	10.92	4.540	-0.4930*
R. H.	12	669.432	10.92	6.669	+0.7660**

* Significant at $P < 0.1$ / *Significatif au seuil de $P < 0,1$* . ** Significant at $P < 0.05$ / *Significatif au seuil de $P < 0,05$* . NS : Not significant / *Non significatif*.

Table II. Efficacy of different concentrations of Dimecron for the control of stem borer *Psiloptera fastuosa*.

Tableau II. Efficacité de différentes concentrations de Dimecron dans la lutte contre le perforateur de la tige *Psiloptera fastuosa*.

Insecticide conc.	Mortality replication			Mean percentage of mortality $\pm$ S. E.	Mean mortality & SE of repl.
	I	II	III		
<i>Conc. en insecticide</i>	<i>Répétition</i>			<i>Pourcentage moyen de mortalité $\pm$ Ecart type</i>	<i>Mortalité moyenne & Ecart type pour la répétition</i>
	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>		
Dimecron 0.01	64	44	52	54.42 $\pm$ 4.8429	53.33 $\pm$ 4.7455 a
Demicron 0.02	45	44	43	44.90 $\pm$ 0.4808	44.00 $\pm$ 0.4714 a1
Dimecron 0.03	89	90	82	88.78 $\pm$ 2.1000	78.33 $\pm$ 0.9824 a2
Dimecron 0.04	96	92	95	96.26 $\pm$ 1.0000	94.33 $\pm$ 0.9824 a3
Dimecron 0.05	83	65	73	75.17 $\pm$ 4.3400	73.66 $\pm$ 4.250 a4
Control Water / <i>Témoin Eau</i>	01	02	01	01.36 $\pm$ 0.2700	0.133 $\pm$ 0.272 a5
Test probability different / test					
a5 - a = $P < 0.05$	a - a1 = NS			a1 a2 = $P < 0.01$	a2 - a4 = NS
a5 - a1 = $P < 0.01$	a - a2 = $P < 0.05$			a1 - a3 = $P < 0.01$	a3 - a4 = NS
a5 - a2 = $P < 0.01$	a - a3 = $P < 0.05$			a1 - a4 = $P < 0.01$	a5 - a4 = $P < 0.01$
a5a3 = $P < 0.01$	a - a4 : NS			a2 - a3 : NS	

Metcalf and Flint (1960) recommended the use of P.D.C.B. (para dichlorobenzene in 1 ml of carbon bisulfite in alcohol), which if not used properly causes plant injury. Pruthi and Batra (1960), while working on allied borer mentioned the possibility of using 0.1% DDT or BHC in the borer hole with the help of syringe in addition to their recommendation of P.D.C.B. Metcalf and Flint (1960) also reported application of 5% rotenone extract in acetone using an oil or similar device. In the present investigation, it was recorded that 0.04% Dimecron can safely be used for the control of this pest *Psiloptera fastuosa* and it was highly effective. Hence, it is recommended to control this pest.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are thankful to the CAB International Institute of Entomology British Museum London for the identification of this pest.

REFERENCES

- DHAR S. L., MANDAL K. C., SINGH R. N., BHENGRA S. R. & K. SENGUPTA (1988) Some records of pest and predators related to primary tasar food plants and *Antheraea mylitta* in Bihar. Indian J. Seric. Vol. XXVII, no. 2, 151-153.
- DOWDY W. W. (1944) The influence of temperature on vertical migration of invertebrates inhabiting in different soil types. Ecology, 25: 449-460 p.
- METCALF C. I. & FLINT W. P. (1960) Destructive and useful insects. D. C. Crow Hill Book Company New York 720-721 p.
- NIELSEN M. G. (1955 b) Studies on the Enchytridae 2. Field studies. Naturas Jutl. 4: 1-58 p.
- PRUTHI H. S. & BATRA H. N. (1960) Some important fruit pest on North West. Indian coun. Agric. Res. Bull. 80-94 p.
- RYKE P. A. J. & LOOTS G. (1967) The composition of microarthropods fauna in South Africa. Soils in progress in soil biology (Graff G. & Satchell J. ed.) 538-546 p.
- SINGH P. K. & DAS P. K. (1999) Seasonal intensity of infestation of stem borer, *Zeuzera indica* Herrich (Lepidoptera) in Som *Machilus bombycina* King and Soalu, *Litsaea polyantha* Juss and its control. Sericologia 39(1), 135-139.
- USHER M. B. (1976) Seasonal and vertical distribution of a population of soil arthropods = cryptostigmata, Pedobiologia, 15(5), 364-374.

INTENSITE SAISONNIERE DE L'INFESTATION D'ARJUNA (*TERMINALIA ARJUNA*) PAR LE PERFOREUR DE LA FEUILLE *PSILOPTERA FASTUOSA* (COLEOPTERA) ET SON CONTROLE

A. K. SINGH*, B. D. SINGH & S. K. TIWARI

Central Tasar Research & Training Institute, Research Extension Centre, Katghora,
Bilaspur (M. P.), Inde.

Psiloptera fastuosa est un parasite sérieux d'*Arjuna*. *Terminalia arjuna*, qui est une plante hôte primaire du ver à soie tasar *Antheraea mylitta* D. utilisée pour la production de soie tasar à l'échelle commerciale. Les larves de cet insecte percent la tige et forment des tunnels en détruisant le xylem et le phloème. L'infestation par ce parasite a lieu toute l'année sur cette plante hôte et elle atteint un sommet en février (41 %) avec une baisse soudaine à 22 % en mars, puis elle diminue de près d'un quart (9 %) pendant les mois d'août – septembre. On a analysé de manière statistique l'infestation des plantes et les facteurs physiques pour comprendre les effets de ces facteurs sur l'infestation. L'analyse du coefficient de corrélation révèle que le degré d'infestation est négativement corrélé [$r : -0,3223$] à la température et positivement corrélé [$r : +0,7660$] à l'humidité relative. Pour lutter contre ce parasite, on montre que le colmatage des trous avec du coton trempé dans du phosphamidon à 0,04 % (nom de marque Dimecron) est le plus efficace pour réduire l'infestation de 96 %, ce qui est très significatif à $P < 0,001$. Il est donc recommandé pour lutter contre ce parasite.

INTRODUCTION

Les plantes arjuna, *Terminalia arjuna*, sont principalement disponibles dans les forêts des zones d'élevage du tasar dans le Madhya Pradesh, c'est à dire à Bastar, Bilaspur, Raigarh, Surguja, Balaghat, Mandla et Jhabua. C'est l'une des plantes hôtes primaires du ver à soie tasar *Antheraea mylitta* D. Les éleveurs de la région du Madhya Pradesh utilisent les plants arjuna pour l'élevage des vers à soie tasar. Ils paient une somme modique de redevance au ministère de la forêt et obtiennent la permission d'utiliser les plantes arjuna des forêts pour des élevages particuliers. De nombreux parasites et prédateurs attaquent cette plante, c'est à dire *Sphenoptera konbierensis* Kerr., *Sternocera orientalis*, *Laspeyresia pseudonectis* Kerr., *Trioza fletcheri* minor, *Phylloptecta hirsuta*, *Megatrioza hirsuta* et *Psiloptera fastuosa* (Dhar et coll., 1988). Parmi tous ceux-là *Psiloptera fastuosa*, est un parasite sévère, qui infeste une gamme étendue de plantes y compris *Terminalia arjuna* et *Terminalia tomentosa*. On trouve que les larves de ce parasite sont plus destructrices que les adultes en raison de leur parties buccales qui mâchent et creusent. On peut s'assurer de la présence des larves par la présence d'une substance gommeuse sécrétée sur la partie abîmée de la plante et de petites boules de bois mâché mélangé avec des sécrétions reposant sur le sol près de la tige.

* Adresse actuelle : Regional Sericultural Research Station, Sahaspur, Dehradun, Uttaranchal (Inde), auquel la correspondance doit être adressée.

MATERIELS ET METHODES

On utilise pour cette expérience une plantation arjuna plantée en 1987. Toute la zone expérimentale (1,14 hectares) est divisée en 20 blocs. Chaque bloc est constitué de 200 plants arjuna (1,8 m × 1,8 m). On procède selon une conception en blocs aléatoires pour cette expérience. Tous les traitements sont répétés trois fois avec 266 plants par répétition et on considère 98 plants pour recueillir les données en ignorant les rangées du bord. On évalue le pourcentage d'infestation par le perforeur sur la base de la présence de larves ou de trous de sortie sur les arbres. On enregistre l'intensité saisonnière de l'infestation mensuellement en observant les plantes au hasard pendant toute l'année en 1991. On enregistre aussi les données sur les facteurs abiotiques comme la température maximum, la température minimum et l'humidité pendant la même période. On corrèle ensuite ces facteurs avec le degré d'infestation obtenu par l'analyse statistique pour trouver le coefficient de corrélation.

Pour lutter contre l'infestation par le perforeur, on prépare du Phosphamidon (nom de marque, Dimecron) à différentes concentrations, c'est à dire 0,01 %, 0,02 %, 0,03 %, 0,04 % et 0,05 %. On applique l'insecticide en bouchant les trous avec du coton trempé dans différentes concentrations de Dimecron. Pour le témoin, toute la procédure est la même sauf qu'on utilise des mèches de coton trempées dans de l'eau à la place de l'insecticide. On procède au colmatage avec une mèche en fer de 2 mm de diamètre en insérant le coton trempé dans les trous. On détermine l'efficacité des différents traitements en enregistrant le nombre de réapparition des trous chaque mois et la présence de larves. Les données recueillies avec tous les traitements sont analysées de manière statistique. On calcule le pourcentage moyen de mortalité en considérant les larves mortes que l'on divise par le nombre de larves vivantes et que l'on multiplie par 100. On calcule la mortalité moyenne des répétitions en suivant la procédure de Singh et Das (1999).

RESULTATS ET DISCUSSION

Les données enregistrées révèlent que l'infestation par le perforeur est présente pendant toute l'année et atteint un pic en février (40 %), avec une baisse soudaine à 22 % en mars et une diminution de presque un quart (9 %) en août et septembre (fig. 1). Les pics sont étroitement liés au cycle reproductif de cette espèce et les formes immatures dominent pendant la période d'infestation. Usher (1976) a observé qu'on connaît bien les processus cycliques chez les mammifères mais jusqu'à présent ils n'ont pas été prouvés chez les insectes. Ces observations apportent donc un soutien secondaire à cette étude. Ryke et Loots (1969) ont établi que la croissance et la prépondérance de l'infestation sont associées aux fluctuations de la température et de l'humidité relative. Dans cette étude, on trouve que la température et l'humidité relative sont respectivement négativement corrélées ($r = -0,4930$) et positivement corrélées ($r = 0,7660$) (Tableau I).

Des rapports sont disponibles concernant la baisse des populations animales quand la température augmente ou baisse en-dessous d'un seuil critique (Dowdy, 1944). Dans cette étude, la population du perforeur augmente avec la hausse de l'humidité relative. Nielsen (1955) a aussi rapporté que l'humidité joue un rôle significatif dans l'augmentation de la population animale et on a constaté qu'une sécheresse sévère prolongée a des effets sérieux sur la survie des individus.

On évalue l'efficacité des différentes concentrations de Dimecron et on trouve que chez tous les lots traités, le perforeur présente une mortalité de plus de 44 % contre 1,36 % pour le témoin. Le Dimecron à 0,04 % donne le résultat maximum ($96,26 \pm 1,00$) par rapport aux autres traitements (Tableau II).

Lutte :

Cette étude révèle que tous les traitements ont plus de 44 % d'efficacité par rapport au témoin et permettent de lutter à plus de 96 % avec du Dimecron à 0,04 %. Chez le lot témoin, on trouve plus de 98 % de cas de réouverture des trous dans les plantes. Les données présentées dans le Tableau II

montrent que les traitements donnent des résultats significativement différents par rapport au témoin et que l'application de phosphamidon à 0,04 % donne la différence la plus significative ($P < 0,01$).

Metcalf et Flint (1960) ont recommandé l'utilisation de P.D.C.B. (para dichlorobenzène dans 1 ml de bisulfite de carbone dans de l'alcool), qui s'il n'est pas utilisé correctement peut créer des dommages pour la plante. Pruthi et Batra (1960), pendant qu'ils travaillaient sur le perceur ont mentionné la possibilité d'injecter du DDT ou du BHC à 0,1 % à l'aide d'une seringue dans le trou du perceur en plus de l'utilisation de P.D.C.B. recommandée. Metcalf et Flint (1960) ont aussi rapporté l'application d'extrait de roténone à 5 % dans de l'acétone en utilisant de l'huile ou un système similaire. Dans cette étude, on a observé qu'on peut utiliser du Dimecron à 0,04 % sans danger pour lutter très efficacement contre le parasite *Psiloptera fastuosa*. Il est donc recommandé pour lutter contre cet insecte.

FOOD ALLOCATION BUDGETING IN TROPICAL TASAR, *ANTHRAEA MYLITTA* FED ON *TERMINALIA TOMENTOSA*

S. S. RATH, RAJ NARAIN, B. C. PRASAD, G. C. ROY & B. R. R. P. SINHA

Central Tasar Research & Training Institute, Piska Nagari-835 303, Ranchi, Jharkhand, India.

Food allocation budgeting in Anthraea mylitta larvae was studied using Terminalia tomentosa as a host plant. Daily measurement of dry weights of food eaten, faeces produced and dry weight gain by larva was recorded to construct the detailed budget for food. Absolute value for food consumption increased although the relative consumption rate declined with advancement of larval development. The growth rate reached its peak during II instar (0.523) and declined thereafter till V instar (0.088 and 0.089 in male and female respectively). The percentage ingestion of total food consumed in different instars were recorded as 0.2, 1.1, 5.0, 14.1, 79.5 with a biomass production of 0.208%, 1.631%, 6.524%, 20.830% and 70.808% during I, II, III, IV and V instar of development. Female ingested 15.7% more food and retained 39.6% more digested food than male. A total of 88.7% and 88.4% of digested food were expended for respiration, moulting, larval-pupal and pupa-adult transformation in male and female respectively. Male and female allocated 8% and 5.4% of digestible food for silk production respectively, while only 3% was expended for egg production in female. A residual of 4.745% and 3.191% of digestible food were retained in the body in male and female respectively at the time of death.

Keywords: *Anthraea mylitta*, larvae, food allocation budgeting.

INTRODUCTION

Silk is a natural fibre of animal origin produced by a group of insects popularly known as sericigenous insects belonging to order Lepidoptera. *Anthraea mylitta* (Lepidoptera: Saturniidae) is a silk producing insect and is probably the largest lepidopteran in its larval life that spins a cocoon rich in silk (tasar silk) (Akai *et al.*, 1990). It is wild and polyphagous. The larval stage is the only feeding stage and it actively feeds on a variety of food plants. The quality and quantity of food intake, its digestibility and the utilisation of digested food for the growth of larvae determines the overall physiological status of the larvae and influences its performance at all levels like growth rate, development time, final body weight, survival and above all reproduction and enable in successful budgeting of the allocated food for various functions. Food is essential for growth, development, silk production and reproduction. Abundance of food and its quality, various abiotic factors and presence of predators, parasites and diseases together prevent the insect from attaining their physiological potential life performance (Slansky and Scriber, 1985). The consumption and utilization of food influence metabolism, enzyme synthesis, nutrient storage and other activities.

A vital part of studies in nutritional ecology is the assessment of food allocation (utilization) budget. The essence of food allocation budget is to quantify the growth of biomass (*i.e.*, increase in weight) by larvae and production of eggs by the adults and as well as silk for cocoon, moulted cuticle, wings and body of the adult. Earlier a number of authors had studied the food consumption and utilization in *A. mylitta* larva (Nayak *et al.* 1985; Dash and Dash, 1991; Mohanty and Mittra, 1988; Rath *et al.*, 1999; Ojha *et al.*, 2000; Sinha *et al.*, 2000). Studies on growth and development of *A.*

mylitta larva fed on three different host plants revealed that *Terminalia tomentosa* is a comparatively superior host plant that can support the larval growth better (Rath, 2000). Review of literature revealed that none of the earlier studies were devoted towards evaluation of the dry matter utilization, dry matter economy, and dry matter requirement for unit growth, cocoon shell and egg production and to construct food allocation in *A. mylitta* for various activities at different life stages which is the aim of the present communication.

MATERIALS AND METHODS

For the study *Antheraea mylitta* (Eco-race:Daba B.V.) was selected because of its high exploitation potency. Superiority of the host plant *Terminalia tomentosa* that support the larvae best for growth, development and reproduction was reported earlier (Rath *et al.*, 1999, Rath, 2000) and hence chosen as a source of food of the larvae. The chemical nature of the leaves of the host plant *Terminalia tomentosa* is nutritious as compared to other host plants (Sinha *et al.*, 1992). The wild nature of larva and natural calamity, parasites, pests and predators together restrict the possibilities of the study in *in situ* condition to evaluate food consumption and utilization. The uzifly, which parasitizes the larva in III/IV instar of development, obliterates food ingestion and digestion followed by a significant decline in the conversion potential of assimilated food (Rath *et al.*, 2000). The only solution to determine the quantitative aspect of food consumption, utilization and nutrient economy is the *ex situ* condition as mentioned earlier where healthy larvae were fed with fresh and healthy leaves of *Terminalia tomentosa* in sufficient quantity twice a day till the larvae attained maturity (Rath *et al.*, 1999).

There were 5 replications each with 20 larvae. The survivability of larvae was 58-73% during the course of experiment. Buffer stocks were also maintained *at par* with other replications simultaneously to compensate mortality. Larvae of same age and weight from the buffer stock were used to replace the loss due to mortality and larvae used for dry weight determination. Leaves and faeces were kept in an oven at 80°C to determine the dry weight. Larvae were killed by placing it in a freezer for short time and then dried to a constant weight in an oven at 80°C to record the dry weight. For each instar the dry weight of food ingested, digested, faeces produced and increase in dry weight of the larva was recorded. In the present studies, sex could not be separated for first four instars but sex had been separated during V instar. The data recorded during first four instars were common for both the sexes. Spinning of the cocoons was carried out out-door. The harvested cocoons were kept separately till the reproductive activity completed and all commercial (cocoon weight and shell weight) and adult characters (moth weight and egg weight) were recorded. For dry weight determination 5 each of larvae, pupae and moth (of both the sexes) were taken. Dry matter requirement for unit growth, cocoon shell and egg production were calculated and dry matter economy was constructed for male and female separately.

The quantitative nutrition measures the amount of food ingested (F), excreted as faecal matter (E), digested and assimilated (F – E), metabolized (M) and converted into the production of biomass (P). $P = (F - E) - M$. The production of biomass is nothing but increase in weight by the larvae and later on converted in to pupae, adult and a substantial portion is diverted to form eggs and cocoon shell. The various nutritional parameters were recorded and expressed in dry weight basis as described by Waldbauer (1968) as follows:

Relative consumption rate (RCR) = F / TA

Relative growth rate (RGR) = P / TA

Approximate digestibility (AD %) = $100 (F - E) / F$

Efficiency of conversion of ingested food into body matter (ECI %) = $100 (P / F)$

Efficiency of conversion of digested food into body matter (ECD %) = $100 P / (F - E)$

Where F= dry weight of food ingested

E = dry weight of faeces produced

T= duration of feeding (days)

P = dry weight gain of larva

A = mean dry weight of the larva during feeding period

= (Initial weight + final weight)/2

The experiment was carried out during July-August in an ideal condition (temp. $25 \pm 3^\circ\text{C}$, R.H. $77 \pm 7\%$, photoperiod 11 h L: 13 h D). Student's t-test was used to study the sexual difference in various parameters, while the significance of different parameters among instars were studied using ANOVA.

RESULTS AND DISCUSSION

The amount of food ingestion and utilization in *A. mylitta* as a function of life stages and sex is presented in Table I. Feeding behaviour of the larvae is adapted to maximize the rate at which nutrient is absorbed from the gut, thus permitting the maximal rate of growth, even though this leads to a lower efficiency of food utilization than could otherwise be achieved (Reynolds *et al.*, 1985). The insect larva (dry weight 0.002 g at hatching) continues to feed upon leaves of the host plant till maturation (dry weight 8.354 to 9.922 g) with four interruption stages called moulting period. About 0.2%, 1.1%, 5.0%, 14.1% and 79.5% of total food is ingested during I, II, III, IV and V instar of the insect respectively (Table II). Although the food intake increases significantly with advancement in developmental stages the relative consumption rate (RCR) declines significantly from early to late instars. The RCR declined (from 2.521 in I instar) with advancing age (0.605 in male and 0.573 in female in V instar), which might be due to shorter residence time of food in the gut in younger larvae (Slansky and Scriber, 1985). Approximate digestibility (AD) declines significantly up to III instar, followed by a marginal and insignificant rise in IV instar and again declined significantly in V instar. This is in contrast to the report that AD decline with age in many insects (Waldbauer, 1968). The decline in AD with age is associated with the consumption of a higher proportion of indigestible fiber (Waldbauer, 1968) but Kasting and McGinnis (1959) reported more or less constant AD in last three instars of *Agrotis*. In contrast, the net growth efficiency (ECD= efficiency of conversion of digested food) and gross growth efficiency (ECI= efficiency of conversion of ingested food) increases significantly till IV instar followed by a significant decline in V instar (Table I). Similar findings were already reported for *Hepialus humuli* and *Phaleria* (Evans, 1939; Edwards, 1964). This is in contradiction with the findings reviewed by Waldbauer (1968) where ECI and ECD were recorded to increase with age. The body weight gain (in %) is lowest during I instar (0.19-0.23%) and highest during V instars (68.1-73.1%) following higher levels of ingestion and digestion (Table II). The relative growth rate (RGR) of the developing larvae was 0.396 during I instar which reached its highest value during II instar (0.523) which again tends to decline to the lowest during V instar (0.088 in male and 0.089 in female). Similar findings were also reported for tobacco hornworm (Reynold *et al.*, 1985). The fact that the RGR fell continuously with advancing age reveals that the larger animal put less effort into growth than smaller ones despite the maintenance of high absolute growth rate. About (69.6-78.2%) of total digested food is available during V instars for body tissue production and to meet the highest metabolic cost during silk protein synthesis and egg production.

Food consumption and utilization differ significantly in male and female, female has greater nutritional accumulation, as it is associated with egg production. The production of egg involves allocation of substantial amount of energy and nutrients by a female (Table I). The values recorded in female for ingestion, RCR, digestion, gain in body weight, AD%, ECD%, cocoon weight, pupa weight, shell weight and moth weight were found significantly higher (Table I and III). The quantum requirement of ingested and digested food for unit growth, cocoon shell production and egg

production is tabulated in table IV indicates a comparable dry matter requirement by both male and female larvae at different levels. For tissue growth of 1 g the larva requires a consumption of 5.8 to 6 g dry matter and about 2.4 to 2.8 g of assimilated food. At the same time 38 g of ingesta is required to spin a cocoon shell of 1 g in both male and female but the digesta requirement is more in female (18.4 g) than male (15.2 g). The female larva requires consumption of 70.2 g of dry matter per 1 g of egg production, which is equal to 33.9 g of digesta (Table IV).

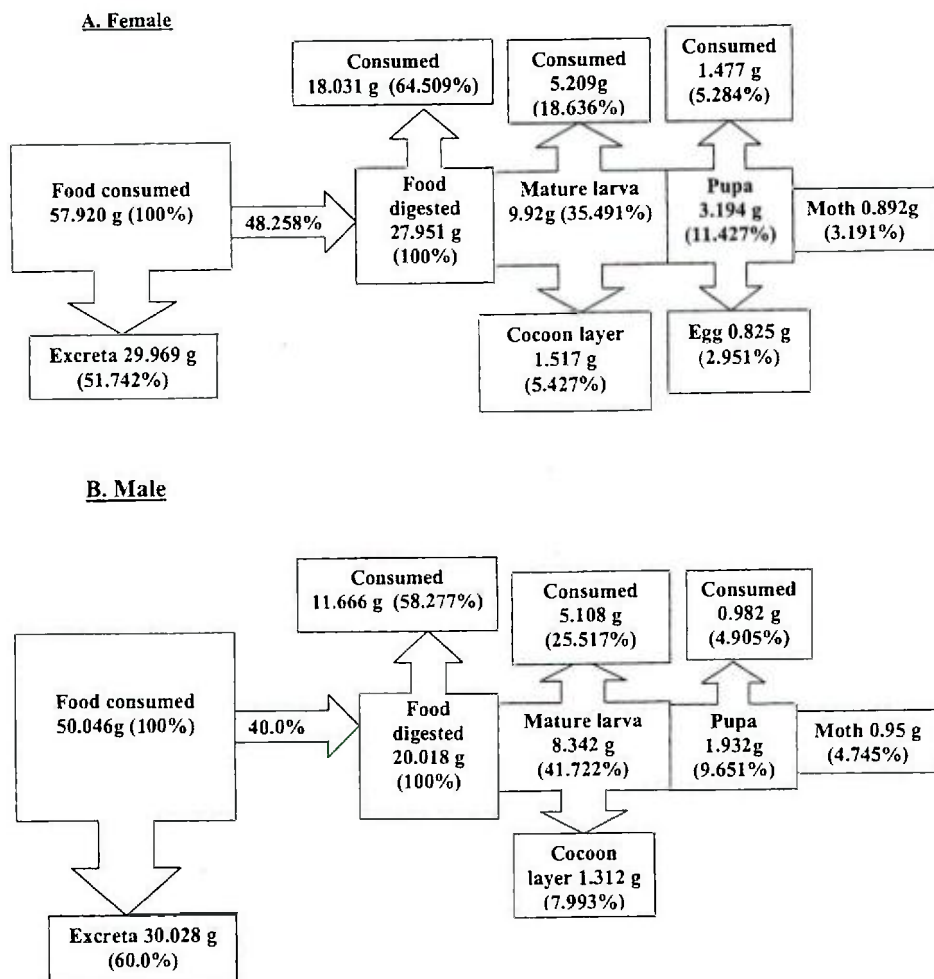


Fig. 1. Food allocation budgeting in tropical tasar (*Antheraea mylitta*) (dry weight basis). Food plant - Asan (*Terminalia tomentosa*).

Fig. 1. Répartition de l'apport en nourriture chez le tasar tropical (*Antheraea mylitta*) (base poids sec). Plante hôte Asan (*Terminalia tomentosa*).

Table I. Dry matter ingested, digested, biomass produced and its utilization efficiency in different larval stages of tropical tasar silkworm (*Antheraea mylitta*).

Tableau I. Matière sèche ingérée, digérée, biomasse produite et efficacité d'utilisation à différents stades larvaires chez le ver à soie tasar tropical (Antheraea mylitta).

Parameter Paramètre	Larval stage Stade larvaire					CD at 5%	Total
	I	II	III	IV	V		
Feeding period (days) <i>Durée de nourrissage (jours)</i>	4	3	3.4	6.6	M 11.7 F 13.7		M 28.7 F 30.7
Ingested (g) <i>Ingérée (g)</i>	0.121	0.611	2.713	7.612	M 38.989 F 46.869 (P < 0.05)	M 0.337 F 0.434	M 50.046 F 57.920 (P < 0.05)
Digested (g) <i>Digérée (g)</i>	0.086	0.383	1.431	4.178	M 13.940 F 21.873 (P < 0.05)	M 0.101 F 0.207	M 20.018 F 27.951 (P < 0.05)
Body weight gain (g) <i>Gain de poids corporel (g)</i>	0.019	0.149	0.596	1.903	M 5.685 F 7.253 (P < 0.05)	M 0.069 F 0.089	M 8.352 F 9.920 (P < 0.05)
AD %	71.074	62.984	52.746	54.887	M 35.754 F 46.764 (P < 0.05)	M 3.225 F 4.105	M 39.999 F 48.258 (P < 0.05)
ECD%	22.093	38.903	41.649	45.548	M 40.782 F 33.160 (P < 0.05)	M 2.146 F 2.440	M 41.722 F 35.491 (P < 0.05)
ECI%	15.702	24.386	21.968	25.000	M 14.581 F 15.477 (P, NS)	M 2.055 F 2.165	M 16.689 F 17.127 (P, NS)
RCR	2.521	2.144	1.705	0.672	M 0.605 F 0.573 (P < 0.05)	M 0.088 F 0.122	M 0.417 F 0.388 (P < 0.05)
RGR	0.396	0.523	0.374	0.168	M 0.088 F 0.089 (P, NS)	M 0.036 F 0.047	M 0.070 F 0.066 (P < 0.05)

M: Male, **F:** Female. Significance between sexes was shown in the parentheses. / **M :** Mâle, **F :** Femelle. Le seuil de différence significative entre les sexes est présenté entre parenthèses.

Table II. Percentage of ingestion and biomass production during different larval stages of *A. mylitta*.

Tableau II. Pourcentage d'ingestion et production de biomasse pendant différents stades larvaires chez *A. mylitta*.

Stage Stade	% of total during entire larval life % du total pendant la vie larvaire entière	
	Ingestion	Biomass production Production de biomasse
I	0.224	0.208
II	1.132	1.631
III	5.026	6.524
IV	14.101	20.830
V	79.523	70.808

Table III. Cocoon weight, pupa weight, shell weight, moth weight and egg weight of *A. mylitta* fed on *T. tomentosa* (dry weight basis).

Tableau III. Poids du cocon, poids de la nymphe, poids de la coque, poids du papillon et poids de l'œuf chez *A. mylitta* nourri sur *T. tomentosa* (sur la base du poids sec).

Sex	Cocoon weight (g)	Pupa weight (g)	Shell weight (g)	Moth weight (g)	Egg weight (g)
Sexe	Poids du cocon (g)	Poids de la nymphe (g)	Poids de la coque (g)	Poids du papillon (g)	Poids de l'œuf (g)
Male / Mâle	3.244	1.932	1.312	0.950	-
Female / Femelle	4.711	3.194	1.517	0.892	0.825
P	< 0.001	< 0.001	< 0.05	< 0.05	-

Figure 1a and 1b is the graphic representation of food economy in *A. mylitta*. Female larvae ingest more food (57.920 g) than that of male (50.046 g). Digestion and quantum of food digested in female is more. The female ingests 15.7% more food and retains 39.6% more digested food than male. From hatching to completion of reproductive activity about 88.7% in male and 88.4% in female of digested food were consumed for respiration, moulting, larval-pupal and pupal-adult transformations. Mature larva retained 35.491% and 41.722% of assimilated food in female and male respectively. The budget allocation revealed that pupal body contained 9.651% and 11.427% of the assimilated food after consuming 25.517% and 18.636%. About 8% of digestible food in male and 5.4% in female were diverted for silk production. In female only 3% of digestible food were allocated for egg

were diverted for silk production. In female only 3% of digestible food were allocated for egg production. At death the female moth retains about 3.2% of digestible food while it constitutes 4.7% in male. This is in contrast to the findings in *B. mori*, where, female ingests 16% more and retains 21% more metabolizable energy than male, spends 20% in silk production, 52% in respiration in either sex and 12% diverted for egg production. At death the female moth retains less than 14% of total metabolizable energy whereas it constitutes 25% in male (Hiratsuka, 1920).

Table IV. Dry matter requirement for growth, cocoon shell and egg production in tropical tasar silkworm (*Antheraea mylitta*).

Tableau IV. Besoin en matière sèche pour la croissance, la coque soyeuse et la production d'œufs chez le ver à soie tasar tropical (Antheraea mylitta).

Parameters	Dry matter requirement (g/g)	
	Male	Female
<i>Paramètres</i>	<i>Besoin en matière sèche (g/g)</i>	
	<i>Mâle</i>	<i>Femelle</i>
Ingesta (g) / growth (g) <i>Ingesta (g) / croissance (g)</i>	5.992	5.839
Digesta (g) / growth (g) <i>Digesta (g) / croissance (g)</i>	2.397	2.818
Ingesta (g) / cocoon shell (g) <i>Ingesta (g) / coque soyeuse (g)</i>	38.145	38.181
Digesta (g) / cocoon shell (g) <i>Digesta (g) / coque soyeuse (g)</i>	15.258	18.425
Ingesta (g) / egg production (g) <i>Ingesta (g) / production d'œuf (g)</i>	-	70.206
Digesta (g) / egg production (g) <i>Digesta (g) / production d'œufs (g)</i>	-	33.880

This study shows that the highest round efficiency at V instar point towards better care for feeding. Nutritious leaves should be provided to the growing larvae to maximize the silk production and egg production.

REFERENCES

- AKAI H., SUTO M., ASAOKA K., NAYAK B. K. & JAGANNATHA RAO C.B. (1990). Rearing of *Antheraea mylitta* with newly developed artificial diets. In Wild Silkmooths (H. Akai and M. Kiuchi Eds.). International Society for Wild Silkmooths, Japan, pp. 121-127.
- DASH A. K. & DASH M. C. (1991). Energetics of Indian tasar silkworm, *Antheraea mylitta* Drury (Lepidoptera: Saturniidae) raised on Asan (*Terminalia tomentosa*) food plant. In: Wild Silkmooths '89-'90 (H. Akai and M. Kiuchi Eds.) International Society for Wild Silkmooths, Japan, pp165-172.
- EDWARDS C. A. (1964) The bionomics of swift moths. 1. The ghost swift moth, *Hepialus humuli* (L) Bull. Ent. Res. 55, 147-160.
- EVANS A. C. (1939) The utilization of food by certain lepidopterous larvae. Trans. R. Ent. Soc. Lond. 89: 13-22.
- HIRATSUKA E. (1920) Researches on the nutrition of silkworm. Bull. Ser. Exp. Sta. Japan. 1: 257-315.
- KASTING R. & MCGINNIS A. J. (1959) Nutrition of pale western cutworm *Agrotis orthogonia* Morr (Lepidoptera: Noctuidae). II Dry matter and nitrogen economy of larvae fed on sprouts of hard red spring and durum wheat. Can. J. Zool. 37, 713-720.
- MOHANTY A.K & MITTRA, A. (1988) Instar duration, daily food consumption, excretion and larval body weight in successive instars of the tropical silkworm *Antheraea mylitta* Drury during development in captivity. Biosphere 1(1&2): 16-27.
- NAYAK B. K., PRADHAN K. C. & SATPATHY B. N. (1985) Studies on Asan (*Terminalia tomentosa*) leaf consumption by successive instars and during the entire larval period of *Antheraea mylitta* Drury. Sericologia, 25(1): 26-31.
- OJHA N. G., SHARAN S. K., RAI S. & PANDEY P. N. (2000) Studies on the sex-wise consumption and utilization of the leaves of different food plants in different ecoraces of tropical tasar silkworm, *Antheraea mylitta* Drury during fifth instar of the first crop. Int. J. Wild Silkmooth & Silk, 5:241-245.
- RATH S. S. (2000) Studies on growth and development of *Antheraea mylitta* Drury (Lepidoptera: Saturniidae) fed on three different natural host plants. Int. J. Wild Silkmooth & Silk, 5:99-181.
- RATH S. S., SINGH B. M. K. & SINHA B.R.R.P. (2000) Effect of uzi parasitism on nutritional parameters and silk production in *Antheraea mylitta* D. Int. J. Wild Silkmooth & Silk, 5:179-103.
- RATH S. S., SINHA B. R. R. P. & THANGAVELU K. (1999) Comparative food utilization and adult characters in *Antheraea mylitta* D. fed on different host plants. Proceedings in National Seminar on Tropical Sericulture: Non-mulberry Sericulture, Silk Technology, Sericulture Economics and Extension, Vol. 3, pp. 12-16, University of Agricultural Sciences, GKVK, Bangalore.
- REYNOLDS S. E., NOTTINGHAM S. F. & STEPHENS A. E. (1985) Food and water economy and its relation to growth in fifth instar larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. J. Insect Physiol. 31, 119-127.
- SINHA U. S.P., SINHA A. K., SRIVASTAVA, P. P. & BRAHMACHARI B. N. (1992) Studies on the variation in chemical constituents in relation to maturity of leaves in three primary food plants of tropical tasar silkworm, *Antheraea mylitta* D. Indian J. Seric. 31(1): 83-86.
- SINHA U. S. P., BAJEPEYI C. M., SINHA A. K., BRAHMACHARI B. N. & SINHA B.R.R.P. (2000) Food consumption and utilization in *Antheraea mylitta* Drury larvae. Int. J. Wild Silkmooth & Silk, 5:182-186.
- SLANSKY F. JR., & SCRIBER J. M. (1985) Food consumption and utilization. In "Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Vol. 4, Regulation: Digestion, Nutrition, Excretion" (G. A. Kerkut and L. I. Gilbert, Eds.), pp. 88-163, Pergamon Press, Oxford.
- WALDBAUER G. P. (1968). The consumption and utilization of food by insects. In Advances of Insect Physiology, 5: 229-288.

BILAN ALIMENTAIRE CHEZ LE TASAR TROPICAL *ANTHERAEA MYLITTA* D. NOURRI SUR *TERMINALIA* *TOMENTOSA*

S. S. RATH, RAJ NARAIN, B. C. PRASAD, G. C. ROY & B. R. R. P. SINHA

Central Tassar Research & Training Institute, Piska Nagari – 835 303, Ranchi, Jharkhand, Inde.

Nous avons étudié le bilan alimentaire chez les larves *Antheraea mylitta* en utilisant *Terminalia tomentosa* comme plante hôte. On enregistre les mesures journalières pour les poids secs de nourriture consommée et des excréments produits et pour le gain de poids sec par les larves afin de déterminer le bilan détaillé de la nourriture. La valeur absolue pour la consommation de nourriture augmente bien que le taux de consommation relative baisse au fur et à mesure que la larve se développe. Le taux de croissance atteint son pic pendant le 2^{ème} âge (0,523) et baisse ensuite jusqu'au 5^{ème} âge (0,088 et 0,089 respectivement chez les mâles et les femelles). On enregistre le pourcentage d'ingestion totale de nourriture consommée pendant les différents âges qui est de 0,2 ; 1,1 ; 5,0 ; 14,1 ; 79,5 ; avec une production de biomasse de 0,208 % ; 1,631 % ; 6,254 % ; 20,830 % et de 70,808 % pendant les 1^{er}, 2^{ème}, 3^{ème}, 4^{ème} et 5^{ème} âges. La femelle ingère 15,7 % de nourriture en plus et retient 39,6 % de nourriture digérée de plus que le mâle. Un total de 88,7 % et de 88,4 % de nourriture digérée est consacrée à la respiration, à la mue, à la transformation larvo-nymphale et nymphe-adulte respectivement chez le mâle et la femelle. Le mâle et la femelle accordent respectivement 8 % et 5,4 % de la nourriture assimilable à la production de soie, tandis qu'il n'y a que 3 % qui sont consacrés à la production d'œufs chez la femelle. Un restant de 4,745 % et de 3,191 % de nourriture assimilable est retenu respectivement dans le corps du mâle et de la femelle au moment de la mort.

INTRODUCTION

La soie est une fibre naturelle d'origine animale produite par un groupe d'insectes connus populairement sous le nom d'insectes séricigènes appartenant à l'ordre des Lépidoptères. *Antheraea mylitta* (Lepidoptera : Saturniidae) est un insecte producteur de soie et est probablement le plus grand lépidoptère pendant sa vie larvaire qui file un cocon riche en soie (soie tassar) (Akai et coll., 1990). Il est sauvage et polyphage. Le stade larvaire est le seul stade d'alimentation et il se nourrit activement sur diverses plantes. La qualité et la quantité de la nourriture absorbée, sa digestibilité et l'utilisation de la nourriture digérée pour la croissance des larves déterminent l'état physiologique général des larves et influencent la performance à tous les niveaux : taux de croissance, durée de développement, poids corporel final, survie et par-dessus tout la reproduction et permettent une répartition réussie de la nourriture attribuée aux diverses fonctions. La nourriture est essentielle à la croissance, au développement, à la production de soie et à la reproduction. L'abondance de nourriture et sa qualité, des facteurs abiotiques variés et la présence de prédateurs, de parasites et de maladies empêchent les insectes d'atteindre leur performance potentielle physiologique vitale (Slansky et Scriber, 1985). La consommation et l'utilisation de nourriture ont une influence sur le métabolisme, la synthèse des enzymes, le stockage des nutriments et les autres activités.

Une partie primordiale des études en écologie nutritionnelle consiste en l'évaluation de la répartition de l'apport en nourriture (utilisation). L'objectif de l'étude de la répartition de la nourriture

utilisée est de quantifier la croissance de la biomasse (c'est à dire l'augmentation en poids) des larves et la production des œufs par les adultes, de soie pour le cocon, de cuticules muées, des ailes et du corps de l'adulte. Un certain nombre d'auteurs ont étudié la consommation et l'utilisation de la nourriture chez les larves *A. mylitta* (Nayak et coll., 1985 ; Dash et Dash, 1991 ; Mohanty et Mittra, 1988 ; Rath et coll., 1999 ; Ohja et coll., 2000 ; Sinha et coll., 2000). Les études sur la croissance et le développement des larves *A. mylitta* nourries sur trois types différents de plantes hôtes révèlent que *Terminalia tomentosa* est comparativement une plante hôte supérieure qui peut mieux soutenir la croissance larvaire (Rath, 2000). L'étude de la littérature montre qu'aucune étude précédente n'a été consacrée à l'évaluation de l'utilisation de matière sèche, l'économie de matière sèche et le besoin en matière sèche pour la croissance, la coque soyeuse et la production d'œufs et pour déterminer l'utilisation de la nourriture chez *A. mylitta* pour les diverses activités aux différents stades de vie, ce que nous nous sommes efforcés d'analyser dans cette étude.

MATERIELS ET METHODES

Pour l'étude, on a sélectionné *Antheraea mylitta* (ecorace : Daba B. V) en raison de son potentiel d'exploitation élevé. On a rapporté précédemment la supériorité de la plante hôte *Terminalia tomentosa* qui soutient le mieux les larves pour leur croissance, leur développement et leur reproduction (Rath et coll., 1999, Rath, 2000) et elle a donc été choisie comme source de nourriture pour les larves. La composition chimique des feuilles de la plante hôte *Terminalia tomentosa* est nutritive par comparaison aux autres plantes hôtes (Sinha et coll., 1992). La nature sauvage des larves et les calamités naturelles, les parasites, les insectes et les prédateurs restreignent les possibilités d'étude *in situ* pour évaluer la consommation et l'utilisation de nourriture. La mouche uzi qui parasite les larves pendant les III / IVème âge du développement, efface l'ingestion et la digestion de nourriture et ils se produit ensuite un déclin significatif du potentiel de conversion de la nourriture assimilée (Rath et coll., 2000). La seule solution pour déterminer les aspects quantitatifs concernant la consommation, l'utilisation de nourriture et les économies de nutriments est la condition *ex situ* mentionnée précédemment où on nourrit des larves saines avec des feuilles fraîches et saines de *Terminalia tomentosa* en quantité suffisante deux fois par jour jusqu'à ce que les larves atteignent leur maturité (Rath et coll., 1999).

Il y a 5 répétitions de 20 larves chacune. Au cours de l'expérience, la survie des larves est de 58 à 73 %. On maintient aussi des stocks régulateurs parallèlement avec les autres répétitions pour compenser la mortalité. On utilise des larves du même âge des stocks régulateurs pour remplacer la perte due à la mortalité des larves et pour déterminer le poids sec. On conserve les feuilles et les excréments dans un four à 80° C pour déterminer le poids sec. On supprime les larves en les plaçant dans un congélateur pendant une courte durée, puis on les sèche jusqu'à un poids constant dans un four à 80° C pour enregistrer le poids sec. On enregistre le poids sec de la nourriture ingérée, digérée, des excréments et l'augmentation en poids sec des larves pour chaque âge. Dans cette étude, on ne peut pas séparer les sexes pendant les quatre premiers âges mais on peut le faire au cours du 5^{ème} âge. Les données enregistrées pendant les quatre premiers âges sont communes pour les deux sexes. On procède au filage des cocons à l'extérieur. Les cocons recueillis sont conservés séparément jusqu'à ce qu'à l'activité reproductive soit terminée et on enregistre tous les caractères commerciaux (poids du cocon et poids de la coque) et adultes (poids du papillon et poids de l'œuf). Pour la détermination du poids sec, on prend 5 larves, 5 nymphes et 5 papillons (des deux sexes). On calcule le besoin en matière sèche pour la croissance, la coque soyeuse, la production d'œufs et on détermine le bilan de matière sèche séparément pour les mâles et les femelles.

La nutrition quantitative mesure la quantité de nourriture ingérée (F), expulsée en matières fécales (E), digérée et assimilée (F – E), métabolisée (M) et convertie en production de biomasse (P). $P = (F - E) - M$. La production de biomasse entraîne une augmentation en poids des larves et plus tard lors de leur transformation en nymphes et en adultes et une part importante est utilisée pour former

les œufs et la coque soyeuse. On enregistre les divers paramètres nutritionnels et on les exprime sur la base du poids sec d'après la description de Waldbauer (1968) ci-dessous :

Taux de Consommation Relative (RCR) = F / TA

Taux de Croissance Relative (RGR) = P / TA

Digestibilité approximative (% AD) = $100 (F - E) / F$

Efficacité de conversion de la nourriture ingérée en matière corporelle (% ECI) = $100 (P / F)$

Efficacité de conversion de la nourriture digérée en matière corporelle (% ECD) = $100 P / (F - E)$

Où F = poids sec de la nourriture ingérée

E = poids sec des excréments produits

T = durée de nourrissage (jours)

P = gain de poids sec des larves

A = poids sec moyen des larves pendant la période de nourrissage = (poids initial + poids final) / 2

L'expérience a été réalisée en juillet – août dans des conditions idéales (temp. $25 \pm 3^\circ \text{C}$, H. R. $77 \pm 7\%$, photopériode 11 h L : 13 h O). On utilise le test-t de Student pour étudier la différence sexuelle pour les différents paramètres tandis qu'on étudie la signification des différences des paramètres entre les âges en utilisant l'Analyse de Variance (ANOVA).

RESULTATS ET DISCUSSION

La quantité de nourriture ingérée et utilisée chez *A. mylitta* en fonction des stades de vie et du sexe est présentée dans le Tableau I. Le comportement alimentaire des larves est adapté pour maximiser le taux auquel le nutriment est absorbé à partir de l'intestin, ce qui permet le taux maximal de croissance bien que cela entraîne une efficacité plus faible d'utilisation de la nourriture que l'on pourrait atteindre autrement (Reynolds et coll., 1985). La larve de l'insecte (poids sec 0,002 g à l'éclosion) continue à se nourrir sur les feuilles de la plante hôte jusqu'à sa maturité (poids sec 8,354 à 9,922 g) avec quatre périodes d'interruption appelées périodes de mue. Environ 0,2 % ; 1,1 % ; 5 % ; 14,1 % et 79,5 % de la nourriture totale est ingérée respectivement pendant les 1^{er}, 2^{ème}, 3^{ème}, 4^{ème} et 5^{ème} âges (Tableau II). Bien que l'absorption de nourriture augmente considérablement avec les stades de développement, le taux de consommation relatif (RCR) baisse considérablement du premier aux derniers âges. Le RCR baisse (2,521 au 1^{er} âge) avec l'avancement en âge (0,605 chez le mâle et 0,573 chez la femelle au 5^{ème} âge), ce qui pourrait être dû à la plus courte période de présence de la nourriture dans l'intestin chez les larves plus jeunes (Slansky et Scriber, 1985). La digestibilité approximative (AD) baisse considérablement jusqu'au 3^{ème} âge, suivie par une augmentation marginale et non significative au 4^{ème} âge et par une baisse significative au 5^{ème} âge. Cela est en contradiction avec le rapport sur le déclin de l'AD avec l'âge chez de nombreux insectes (Waldbauer, 1968). La baisse de l'AD avec l'âge est associée à la consommation d'une proportion plus élevée de fibres non digestibles (Waldbauer, 1968) mais Kasting et McGinnis (1959) ont rapporté une AD plus ou moins constante pendant les trois derniers âges chez *Agrotis*. Par opposition, l'efficacité nette de croissance (ECD = efficacité de conversion de la nourriture digérée) et l'efficacité brute de croissance (ECI = efficacité de conversion de la nourriture ingérée) augmentent considérablement jusqu'au 4^{ème} âge, puis baissent significativement au 5^{ème} âge (Tableau I). On a déjà rapporté des observations similaires chez *Hepialus humuli* et *Phaleria* (Evans, 1939 ; Edwards, 1964). Cela est en contradiction avec les observations de Waldbauer (1968) qui a enregistré que l'ECI et l'ECD augmentent avec l'âge. Le gain de poids corporel (en %) est plus faible pendant le 1^{er} âge (0,19 - 0,23 %) et plus élevé pendant le 5^{ème} âge (68,1 – 73,1 %) suite à des niveaux d'ingestion et de digestion plus élevés (Tableau II). Le taux de croissance relative (RGR) des larves en développement est de 0,396 pendant le 1^{er} âge et il atteint sa valeur la plus élevée au 2^{ème} âge (0,523) et tend à baisser au plus bas pendant le 5^{ème} âge (0,088 chez le mâle et 0,089 chez la femelle). On a aussi rapporté des observations similaires pour le ver du tabac (Reynolds et coll., 1985). Le fait que

le RGR baisse continuellement avec l'avancement en âge révèle que l'animal plus gros fournit moins d'efforts dans la croissance que les plus petits malgré le maintien d'un taux absolu de croissance élevé. Environ 69,6 à 78,2 % de la nourriture totale digérée est disponible pendant le 5^{ème} âge pour la production de tissu corporel et pour répondre au coût métabolique plus élevé pendant la synthèse des protéines de soie et la production des œufs.

La consommation et l'utilisation diffèrent de manière significative chez le mâle et la femelle, la femelle présentent une accumulation nutritionnelle plus grande puisqu'elle est associée à la production d'œufs. La production des œufs nécessite l'utilisation d'une quantité importante d'énergie et de nutriments par une femelle (Tableau I). Les valeurs enregistrées chez la femelle pour l'ingestion, le RCR, la digestion, le gain de poids corporel, le % AD, le % ECD, le poids du cocon, le poids de la nymphe, le poids de la coque et le poids du papillon s'avèrent significativement plus élevées (Tableau I et III). Le besoin quantitatif en nourriture ingérée et digérée pour la croissance, la production de coque soyeuse et la production d'œufs est présenté dans le Tableau IV qui montre un besoin comparable en matière sèche à la fois par les larves mâles et femelles à différents niveaux. Pour la croissance d'1 g de tissu, la larve a besoin d'une consommation de 5,8 à 6 g de matière sèche et d'environ 2,4 à 2,8 g de nourriture assimilée. Au même moment, il faut 38 g d'ingesta pour filer une coque soyeuse de 1 g à la fois chez les mâles et les femelles mais le besoin en digesta est plus important chez les femelles (18,4 g) que chez les mâles (15,2 g). La larve femelle a besoin d'une consommation de 70,2 g de matière sèche pour produire 1 g d'œuf, ce qui est égal à 33,9 g de digesta (Tableau IV).

La figure 1a et 1b est la représentation graphique de la répartition de la nourriture chez *A. mylitta*. Les larves femelles ingèrent plus de nourriture (57,920 g) que les mâles (50,046 g). La digestion et la quantité de nourriture digérée sont plus importantes chez les femelles. La femelle ingère 15,7 % de plus de nourriture et retient 39,6 % de plus de nourriture digérée que le mâle. De l'éclosion à la fin de l'activité reproductive environ 88,7 % de la nourriture digérée chez le mâle et 88,4 % chez la femelle sont consommés pour la respiration, la mue, les transformations larve – nymphe et nymphe – adulte. La larve à maturité retient 35,491 % et 41,722 % de la nourriture assimilée chez la femelle et le mâle respectivement. La répartition de l'utilisation révèle que le corps nymphal contient 9,651 % et 11,427 % de la nourriture assimilée après en avoir consommé 25,517 % et 18,636 %. Environ 8 % de la nourriture digérée chez le mâle et 5,4 % chez la femelle sont destinés à la production de soie. Chez la femelle, seulement 3 % de la nourriture digérée est affecté à la production des œufs. A sa mort, le papillon femelle retient environ 3,2 % de la nourriture digérée tandis que cela représente 4,7 % chez le mâle. Cela est en contradiction avec les observations chez *B. mori* selon lesquelles la femelle ingère 16 % en plus et retient 21 % de plus d'énergie métabolisable que le mâle, dépense 20 % dans la production de soie, tandis que 52 % sont dépensés dans la respiration chez les deux sexes et 12 % sont attribués à la production d'œufs. A sa mort, le papillon femelle retient moins de 14 % de l'énergie métabolisable totale tandis que cela représente 25 % chez le mâle (Hiratsuka, 1920).

Cette étude montre que l'efficacité générale plus élevée au 5^{ème} âge nécessite une grande attention pour le nourrissage. Il faut fournir des feuilles nutritives aux larves en croissance pour maximiser la production de soie et la production d'œufs.

STUDIES ON INDUCED OVIPOSITION IN TROPICAL TASAR SILKMOTH, *ANTHRAEA MYLITTA* DRURY

RAJ NARAIN, B. C. PRASAD, O. P. DUBEY, B. R. R. P. SINHA & K. THANGAVELU

Central Tasar Research and Training Institute, P.O. - Piska Nagri, Ranchi - 835303, India.

The tasar silkmoth, *Antheraea mylitta* continues to lay eggs for 5 - 6 days. However, the eggs laid on first three days are collected and further processed for preparation of both reproductive and commercial seeds. The quality of eggs laid after 24 hours and their rearing performance are poor. Therefore, a study was designed to induce oviposition by subjecting the moths to stress condition through tarsi amputation. After decoupling, the legs of healthy and selected females were amputated from tarsal region and the moths were kept individually in paper boxes for 24 hours in darkness for oviposition. The result indicates significantly higher coefficient of egg laying (75.02%) under induced condition as compared to controls (41.87 to 44.94%) in the same period, under identical temperature and humidity condition. This technique of tarsi amputation can be used for quick oviposition, which will lead to uniform development of tasar silkworm and facilitate basic and commercial egg production. The most popular ecorace 'Daba' was used in this study.

Keywords: *Antheraea mylitta* D., induced oviposition, tarsi amputation, coefficient of egg laying.

INTRODUCTION

The tropical tasar silkworm, *Antheraea mylitta* Drury being exploited for tasar silk production has great economic importance. Basically wild in nature, it behaves erratically in captivity. Likewise, moth emergence, coupling pattern and oviposition behaviour are also irregular. The tasar silkmoth continues to lay eggs for 5 - 6 days. The egg laying, hatching percentage of eggs, weight and size of the eggs laid on different days show a declining trend from first day onwards (Ahsan *et al.*, 1974). In an attempt to study the feasibility of egg laying under smaller space on paper, earthen cup and petridish, the wings of the moths were cut from the base. The coefficient of egg laying was found best (first crop - 91.07%; second crop - 89.87%) under earthen cup (Jayaswal *et al.*, 1980). Earlier studies on morphology and oviposition behaviour of *A. mylitta* revealed maximum oviposition between 16.00 - 20.00 hours on all the three days of oviposition (Thangavelu *et al.*, 1992). The eggs laid on first two days are superior in quality and have better rearing performance. However, in practice the eggs laid upto 72 hours duration are collected in grainages and utilised for further multiplication because nearly 88 - 90% eggs are laid within this period. The eggs of different duration stagger the larval duration and pose problem in rearing management as the tasar silkworms are reared outdoor on the host plant. Hence, a study was designed for obtaining maximum oviposition within a shorter duration of 24 hours to ensure uniformity in larval and pupal stages.

MATERIALS AND METHODS

The study was conducted at Seed Technology Laboratory, Central Tasar Research and Training Institute, P.O. Piska Nagri, Ranchi, India during August 2000. For the experiment, the cocoons of

Daba ecorace harvested during II crop 2000 were utilized. The emerged male and female moths were selected and allowed to couple for 12 hours. In treatment lot decoupled females' legs were amputated from tarsal region. The wings of the moths were also extirpated one cm above the wing pad as in practice. These treated female moths were kept individually in paper boxes (14 × 14 × 5 cm) for oviposition for 24 hours in darkness. To compare the induced oviposition three different oviposition devices like paper box, earthen cup and plastic box that are in commercial use were used. In these control lots only the wings of the females' moths were extirpated as in the treatment and the moths were kept individually in these devices in darkness for 24 hours for oviposition. In this experiment the number of replications per treatment and number of moths per replication were 5 and 4, respectively. In all 80 female moths were used. The experiment was conducted in Completely Randomized Design (CRD) at normal room temperature (24-27 °C) and humidity (81-95%). The number of eggs laid on first day within 24 hours only was counted. Further, moths were dissected to count the number of unlaid eggs retained in the ovarioles. The coefficient of egg laying was calculated by using the following formula:

$$\text{Coefficient of egg laying} = \frac{\text{Number of eggs laid}}{\text{Total number of laid and unlaid eggs}} \times 100$$

The data thus generated were statistically analyzed for coefficient of egg laying parameter (Arc Sine Transformation) using one-way analysis of variance.

OBSERVATIONS

Coefficient of egg laying in *A. mylitta*:

The data on induced oviposition of 24 hour duration in *A. mylitta* as indicated by coefficient of egg laying are presented in Table I. The ANOVA shows that treatments differed significantly ($F_{3,12} = 42.42 < p = 0.01$). The highest and significant coefficient of egg laying was recorded in case of moth with tarsi amputated + wings extirpated and kept in paper box (75.02%) in comparison to the three controls i.e., paper box (44.94%), earthen cup (42.09%) and plastic box (41.87%).

The earthen cup (diameter- 7cm, height- 3cm) and plastic box (6.5 × 5 × 3cm) being smaller in size were not used for oviposition in tarsi amputated moths because these treated moths in absence of tarsi lay eggs on the paper surface by moving around and thus require space, whereas, moths with their tarsi intact tend to come out and lay eggs on the side walls of the devices i.e., paper box, earthen cup and plastic box. In earthen cups the eggs were also laid on the lower surface of the upper cup as the devices are kept one above the other showing frequent movement of moths during oviposition when legs are intact.

The study reveals that amputation of tarsi induces oviposition (as the wings are extirpated both under experiment and control). Thus the significant difference in coefficient of egg laying under experiment and control is only due to induced condition provided by way of amputation of tarsi.

DISCUSSION

The technique of tarsi amputation for induced oviposition in *A. mylitta* as evidenced by the result of the present investigation can be judiciously employed in tasar grainage for the benefit of the industry. At this stage of study it is not advisable to use this technique for commercial seed production. However, it can be used for maintenance and multiplication of parental seed stock because maximum eggs (75.02) are obtained in 24 hours duration by this technique as compared from 88-90% eggs laid in 72 hours duration as in practice. We know that first day laid eggs are superior in quality and have better rearing performance. In addition, the synchronized egg laying will also lead to uniform larval development, thereby shortening the larval duration and minimizing staggered larval growth in a large

population. The application of this technique for oviposition in successive generations may further improve the coefficient of egg laying and tend to induce a desirable change in the oviposition behaviour of *A. mylitta* which may lead to synchronized oviposition, uniform larval development, spinning and synchronized moth emergence like mulberry silkworm, *Bombyx mori*. Ultimately it will result in better grainage and rearing management.

Table 1. Effect of tarsi amputation on Coefficient of egg laying in tasar Silkmoth, *Antheraea mylitta* D.

Tableau 1. Effet de l'amputation tarsienne sur le coefficient de ponte chez le papillon à soie tasar, *Antheraea mylitta* D.

Parameters	Treatment / Traitement				F-value	C.D. at 5%
Paramètres	Treatment Traitement	Control-I Témoin 1	Control-II Témoin 2	Control-III Témoin 3		
Mean coefficient of egg laying $\pm$ Standard Error	75.02 $\pm$	44.94 $\pm$	42.09 $\pm$	41.87 $\pm$	37.52**	7.87
Coefficient moyen de ponte $\pm$ Ecart type	1.56	1.46	2.89	3.83		
Arc sine transformation values of coefficient of egg laying	60.06	42.09	40.42	40.27	-	4.43
Valeurs de transformation arc sine du coefficient de ponte						
Coefficient of variation	4.64	7.27	15.37	20.44	-	-
Coefficient de variation						

** Significant at 1% level. / Significatif au seuil de 1 %.

Treatment: Tarsi amputated + Wings extirpated and kept in paper box for oviposition. / **Traitement :** Amputation tarsienne + retrait des ailes et conservation dans une boîte en carton pour la ponte.

Control-1: Wings extirpated and kept in paper box for oviposition. / **Témoin-1 :** Retrait des ailes et conservation dans une boîte en carton pour la ponte.

Control-2: Wings extirpated and kept in earthen cup for oviposition. **Témoin 2 :** Retrait des ailes et conservation dans une tasse en terre pour la ponte.

Control-3: Wings extirpated and kept in plastic egg laying box. **Témoin 3 :** Retrait des ailes et conservation dans une boîte de ponte en plastique.

The mechanism and the factors responsible for induced oviposition after tarsi amputation in *A. mylitta* are not known. However, it was early pointed out that humoral factors probably derived from neurosecretory cells in the brain are involved in ovulation and oviposition. The haemolymph of fecundated *B. mori* will induce oviposition when injected into unfertilised females (Mokia 1941) and

it is at the time of oviposition that the neurosecretory material in the adult female *B.mori* is most actively discharged along the axons (Arvy and Gabe 1953). In *Dermestis* mating was found to act as a stimulus for oviposition and appeared to hasten final maturation of eggs (Roth and Willis 1950); in *Aedes aegypti* females ovulation also seemed to be provoked by some hormonal factors liberated when the spermathecae are filled with sperm (Gillet 1956). Nayar (1958) suggested that in the Pyrrhocorid bug, *Iphita limbata* an ovarian hormone induces oviposition response, for injection of watery extract of the right ovary would stimulate the neurosecretory cells to discharge their secretion and induce immediate oviposition. In Saturniids the female moth does not require mating stimulation and starts egg laying wherever it is kept. However, in *A. mylitta* the pre-oviposition period of 2-24 hours can be created through a treatment i.e. by putting the freshly emerged moths on the strings of a specially designed female moth preservation frame (Prasad *et al.*, 2000).

In the present investigation it appears that nervous stimuli received from the mechanical stress of tarsi amputation brings about appropriate behavioural response in *A. mylitta* through hormonal action leading to quick oviposition as the nervous system integrates the activities of the different parts of the body.

It is concluded that the technique of tarsi amputation in *A. mylitta* can be used for maximization of oviposition in shorter duration that will lead to uniformity in tasar silkworm growth and development for maintenance and multiplication of reproductive seed in tasar silk industry.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors are thankful to Sri Suresh Rai, Senior Research Officer (Statistics) of Central Tasar Research & Training Institute, P.O.-Piska Nagri, Ranchi for statistical analysis of the data.

REFERENCES

- AHSAN M. M, JOLLY M. S. & KHATRI R. K. 1974 Some preliminary studies on the various aspects of grainage in tasar silkworm (*A. mylitta* D.); Proceeding of the first international seminar on non-mulberry silk, CTR & TI, Ranchi, October 3-4, 158-169.
- ARVY L. & GABE M. 1953 Donnees histophysiologiques sur la neurosecretion chez quelques Ephemeropteres; Cellule 55 203- 222.
- GILLET J. D. 1956 Initiation and promotion of ovarian development in the mosquito *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus); Ann. Trop. Med. Parasit 50 375-380.
- JAYASWAL J, KHATRI R. K. & SUBRAMANIAM R. K. 1980 Studies on egg laying in tasar silkworm (*A. mylitta*) under different conditions: Annual Report, CTR&TI, Ranchi, pp. 61-64
- MOKIA G. G. 1941 Contribution to the study of hormones in insects; C. R. Acad. Sci. U. R. S. S. 30 371-373.
- NAYAR K. K. 1958 Studies on the neurosecretory system of *Iphita limbata* Stal (V) Probable endocrine basis of oviposition in the female insect; Proc. Indian Acad. Sci. 67 233-249.
- PRASAD B. C., NARAIN R., KUMAR N., RATH S. S., VERMA V. K., Negi B. B. S. & THANGAVELUK. 2000 A new technology for female moth preservation in tasar grainage; Indian Silk 39(1) 15 & 24.
- ROTH L. M & WILLIS E. R. 1950 The oviposition of *Dermestes ater* Degeer, with notes on bionomics under laboratory condition; Amer. Midl. Nat. 44 427-447.
- THANGAVELU K., DUBEY O. P., BAJPEYI C. M. & KUMAR N. 1992 Oviposition rhythm, potential and retention capacity in tropical tasar silkworm, *Antheraea mylitta* D. (Lepidoptera : Saturniidae); In: Bioecology and control of Insect Pests. S. C. Goel (Ed.) Muzaffarnagar India pp. 90-94

ETUDES SUR L'INDUCTION DE LA PONTE CHEZ LE PAPILLON TASAR TROPICAL, *ANTHERAEA MYLITTA* DRURY

RAJ NARAIN, B. C. PRASAD, O. P. DUBEY, B. R. R. P. SINHA & K. THANGAVELU

Central Tasar Research and Training Institute, P. O. Piska Nagri, Ranchi -835303, Inde.

*Le papillon tasar, **Antheraea mylitta** pond des œufs pendant 5 à 6 jours. Les œufs pondus les trois premiers jours sont recueillis et traités par la suite pour la préparation de graines reproductives et commerciales. La qualité des œufs pondus après 24 heures et leur performance d'élevage sont mauvaises. Nous avons donc conçu une étude pour induire la ponte en soumettant les papillons à des conditions de stress, en amputant leur tarse. Après le désaccouplement, on ampute les pattes de femelles saines et sélectionnées dans la zone tarsienne et on conserve les papillons pour la ponte individuellement dans des boîtes en papier pendant 24 heures dans l'obscurité. Les résultats indiquent que le coefficient de ponte est significativement plus élevé (75.02 %) dans les conditions induites par comparaison aux témoins (41.87 à 44.94 %) pendant la même période avec des conditions de température et d'humidité identiques. On peut utiliser cette technique d'amputation tarsienne pour obtenir une ponte rapide, qui permet un développement uniforme du ver à soie tasar et facilite la production commerciale et de maintenance d'œufs. Nous avons utilisé dans cette étude l'écorace la plus populaire : "Daba".*

INTRODUCTION

Le ver à soie tasar tropical, *Antheraea mylitta* Drury étant exploité pour la production de soie tasar, il a une très grande importance sur le plan économique. Fondamentalement sauvage, il a un comportement irrégulier en captivité. De même, l'émergence des papillons, le mode d'accouplement et le comportement de ponte sont aussi irréguliers. Le papillon tasar pond des œufs pendant 5 à 6 jours. La ponte des œufs, le pourcentage d'éclosion des œufs, le poids et la taille des œufs pondus pendant les différents jours déclinent dès le premier jour (Ahsan et coll., 1974). Pour étudier la faisabilité de la ponte dans un espace plus petit sur du papier, dans une tasse en faïence et une boîte de Petri, on a coupé les ailes des papillons à la base. Il s'avère que le coefficient de ponte est le meilleur (première récolte - 91,07 %, deuxième récolte - 89,87 %) dans une tasse en faïence (Jayaswal et coll., 1980). Les études précédentes sur la morphologie et le comportement de ponte d'*A. mylitta* révèlent une ponte maximum entre 16.00 et 20.00 heures pendant les trois jours de ponte (Thangavelu et coll., 1992). Les œufs pondus les deux premiers jours sont supérieurs en qualité et donnent une meilleure performance d'élevage. Cependant, dans la pratique dans les centres de grainage on recueille les œufs pondus jusqu'à 72 heures et on les utilise pour la multiplication ultérieure parce que presque 88 à 90 % des œufs sont pondus pendant cette période. Les œufs d'âge différent échelonnent la durée de vie larvaire et posent des problèmes de gestion de l'élevage puisque les vers à soie tasar sont élevés à l'extérieur sur la plante hôte. On a donc conçu une étude pour obtenir une ponte maximum pendant une durée plus courte de 24 heures afin d'assurer l'uniformité des stades larvaire et nymphal.

MATERIELS ET METHODES

L'étude a été réalisée au Laboratoire de Technologie de Grainage, du *Central Tassar Research and Training Institute*, P. O Piska Nagri, Ranchi, en Inde en août 2000. Pour l'expérience, on utilise les cocons de l'écotaxe Daba recueillis pendant la deuxième récolte en 2000. On sélectionne des papillons mâles et femelles ayant émergé et on les laisse s'accoupler pendant 12 heures. Chez le lot traité, on ampute les pattes des femelles désaccouplées à partir de la zone tarsienne. On retire aussi les ailes des papillons un cm au-dessus du coussinet de l'aile comme dans la pratique. Ces papillons femelles traités sont conservés individuellement dans des boîtes en papier (14 × 14 × 5 cm) pour la ponte pendant 24 heures dans l'obscurité. Pour comparer la ponte induite, on utilise trois systèmes différents de ponte utilisés dans le commerce : une boîte en papier, une tasse en faïence et une boîte en plastique. Chez ces lots témoins, comme dans le traitement on n'extirpe que les ailes des papillons femelles, et on conserve les papillons individuellement dans ces dispositifs à l'obscurité pendant 24 heures pour la ponte. Dans cette expérience, le nombre de répétitions par traitement et le nombre de papillons par répétition est respectivement de 5 et 4. En tout, on utilise 80 papillons femelles. On réalise l'expérience selon une Conception Complètement Aléatoire (CRD) à une température ambiante de 24 – 27° C et une humidité de 81- 95 %. On ne compte que le nombre d'œufs pondus pendant les 24 heures du premier jour. De plus, on dissèque les papillons pour compter le nombre d'œufs non pondus retenus dans les ovarioles. On calcule le coefficient de ponte en utilisant la formule suivante :

$$\text{Coefficient de ponte} = \frac{\text{Nombre d'oeufs pondus}}{\text{Nombre total d'oeufs pondus et non pondus}} \times 100$$

On analyse statistiquement les données ainsi générées pour le paramètre de coefficient de ponte (transformation arc sin) en utilisant une analyse de variance à un facteur.

OBSERVATIONS

Coefficient de ponte chez *A. mylitta* :

Les données sur la ponte induite en 24 heures chez *A. mylitta* comme l'indique le coefficient de ponte sont présentées dans le Tableau I. L'ANOVA montre que les traitements diffèrent de manière significative ($F_{3, 12} = 42.42 < p = 0,01$). On enregistre le coefficient de ponte le plus élevé et significatif chez les papillons dont le tarse est amputé et dont les ailes sont retirées et que l'on conserve dans une boîte en papier (75,02 %) par comparaison aux trois témoins, c'est à dire la boîte en carton (44,94 %), la tasse en faïence et la boîte en plastique (41,87 %).

La tasse en faïence (diamètre – 7 cm, hauteur – 3 cm) et la boîte en plastique (6,5 × 5 × 3 cm) étant de taille plus petite, elles ne sont pas utilisées pour la ponte chez les papillons amputés dans la zone tarsienne, parce que en l'absence de tarse ces papillons traités, pondent des œufs sur la surface en papier en bougeant et ont donc besoin de plus d'espace, tandis que les papillons au tarse intacte tendent à sortir et à pondre leurs œufs sur les parois des dispositifs, c'est à dire la boîte en papier, la tasse en faïence et la boîte en plastique. Dans les tasses en faïence, les œufs sont aussi pondus sur la surface inférieure de la tasse supérieure étant donné que les dispositifs sont conservés l'un au-dessus de l'autre, ce qui montre un mouvement fréquent des papillons pendant la ponte quand les pattes sont intactes.

L'étude révèle que l'amputation du tarse induit la ponte (puisque les ailes sont extirpées à la fois dans l'expérience et chez le témoin). Ainsi, la différence significative de coefficient de ponte dans l'expérience et chez le témoin est seulement due à la condition d'induction fournie par l'amputation du tarse.

DISCUSSION

Comme le montrent les résultats de notre étude on peut judicieusement employer la technique d'amputation du tarse pour l'induction de la ponte chez *A. mylitta* dans le grainage du tasar pour le bénéfice de l'industrie. A ce stade de l'étude, il n'est pas conseillé d'utiliser cette technique pour la production commerciale de graines. Cependant, on peut l'utiliser pour le maintien et la multiplication des stocks de graines parentales parce qu'on obtient un nombre maximum d'œufs (75,02) en 24 heures avec cette technique par comparaison à 88-90 % d'œufs pondus en 72 heures dans la pratique. On sait que les œufs pondus le 1^{er} jour sont supérieurs et donnent une meilleure performance d'élevage. De plus, la synchronisation de la ponte permet aussi un développement larvaire uniforme, ce qui par là-même raccourcit la durée larvaire et minimise l'échelonnement de la croissance larvaire chez une population importante. L'application de cette technique pour la ponte pour les générations successives pourrait encore améliorer le coefficient de ponte et tendre à induire un changement désirable du comportement de ponte chez *A. mylitta*, ce qui pourrait entraîner une ponte et une émergence des papillons synchronisés, un développement larvaire et un filage uniformes comme chez le ver à soie du mûrier, *Bombyx mori*. Par la suite, cela donnera un meilleur grainage et une meilleure gestion de l'élevage.

On ne connaît pas les mécanismes et les facteurs responsables de l'induction de la ponte après l'amputation du tarse chez *A. mylitta*. Cependant, on a remarqué précédemment que des facteurs humoraux probablement dérivés des cellules neurosécrétrices dans le cerveau sont impliqués dans l'ovulation et la ponte. Quand on injecte l'hémolymphe fécondé de *B. mori* chez des femelles non fertilisées cela entraîne la ponte (Mokia, 1941) et c'est au moment de la ponte que le matériel neurosécréteur de la femelle *B. mori* adulte est le plus activement déchargé le long des axones (Arvy et Gabe, 1953). Chez *Dermestis*, on trouve que l'accouplement agit comme un stimulus sur la ponte et il semble hâter la maturation finale des œufs (Roth et Willis, 1950) ; chez *Aedes aegypti* l'ovulation des femelles semble aussi être provoquée par certains facteurs hormonaux qui se libèrent quand les réceptacles séminaux se remplissent de sperme (Gillet, 1956). Nayar (1958) a suggéré que chez l'insecte Pyrrhocoride, *Iphita limbata*, une hormone ovarienne induit une réponse de ponte, car l'injection d'un extrait aqueux de l'ovaire droit stimule les cellules neurosécrétrices qui déchargent leur sécrétion, ce qui induit une ponte immédiate. Chez les saturnidés, le papillon femelle n'a pas besoin de la stimulation de l'accouplement et il commence à pondre des œufs quel que soit l'endroit où il est conservé. Cependant, chez *A. mylitta*, on peut créer une période de préoviposition de 2 à 24 heures grâce à un traitement, c'est à dire en plaçant les papillons venant d'émerger sur les ficelles d'un cadre de conservation des papillons femelles conçu spécialement (Prasad et coll., 2000).

Dans cette étude, il apparaît que les stimuli nerveux reçus par le stress mécanique de l'amputation tarsienne apportent la réponse comportementale appropriée chez *A. mylitta* grâce à une action hormonale, qui entraîne une ponte rapide alors que le système nerveux intègre les activités des différentes parties du corps.

Nous concluons que la technique d'amputation tarsienne chez *A. mylitta* peut être utilisée pour maximiser la ponte pendant une durée plus courte, ce qui permet l'uniformité de la croissance et du développement du ver à soie tasar pour maintenir et multiplier des graines de reproduction dans l'industrie de la soie tasar.

THE DISCOVERY OF A MULBERRY FOSSIL AND ITS COMPARATIVE STUDIES WITH ITS MODERN RELATIVE SPECIES

KUAI YUAN ZHANG¹ & WANG BAO ZHONG²

1. The Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang, 212018, Jiangsu, China.
2. Institute of Ancient Organisms Fossil Conservation of Shanwang, Shanwang 500008, Shandong, China.

*A mulberry fossil sample was discovered by the authors in Shanwang ore mine in Shandong province in 1982. After studies on the shape and character, the mulberry leaf was identified and named Shanwang mulberry. Compared with modern mulberry species, it belongs to *Morus alba* Linn. species. According to Shanwang's stratum, it can be dated back to 14,400,000 years ago, to the era of mid Miocene or late Miocene.*

Keywords: Fossil, Shanwang mulberry, *Morus alba* Linn.

1. Identification of the mulberry fossil specimen:

The mulberry fossil sample was a complete leaf, whose shape was approximately cordate. The size of the leaf was 151.8 mm in length, 48.24 mm in width. The tip of the leaf was caudate, 3.5 mm in width. The length of the leaf stalk was 57.76 mm and its width was 3.00 mm. The total length of the complete leaf was 209.56 mm. The margin was crenate-dentate or dentate serrate with 34 teeth on the left column and 33 on the right collocated in order. The base was truncate and concave on one side. The veins of midrib had 7 side-nerves on left, 6 on the right, that is to say pinnate. All side nerves furcated while fine veins formed a reticulate. The petiole was a cylinder in shape without groove and stipules which shows that it was a back and ripe leaf. The chief character of leaf modalities and venation were like mulberry, so it was named "Shanwang mulberry" and it was kept in Shanwang palaeontology exhibition hall, its collection number was 820063 (see fig.).

2. Comparison of Shanwang mulberry with homologous species of modern mulberry:

The modern mulberry was distributed in Asia, Latin American, North America, Africa and so on. Mulberry genus has 25 species and 2 varieties (Koidzumi G., 1917), of which 15 species are distributed in China (Anonym, 1985). *Morus alba* Linn, *M. bombycis* Koidzumi and *M. multicaulis* Perr and etc. were found in Shandong province, China. Some people think that *M. multicaulis* Perr. was a variety of *Morus alba* Linn., because their shape of flower organ is similar and there is a crossing ability between them. Shanwang mulberry was different from *M. bombycis* Koidz, for whole forms of Shanwang were consistent with *M. alba* Linn. According to the relationship of leaf blade and margin among Shanwang mulberry, *M. alba* Linn. and *M. bombycis* Koidz, we came to the conclusion that Shanwang mulberry was a homologous species of *M. alba* Linn.



Fig. A Shanwang mulberry fossil specimen.

Fig. Spécimen du fossile de mûrier Shanwang.

3. Era inference of Shanwang mulberry:

Shanwang lies in the Yaoshan countryside, Linq county, Shandong province. The Shanwang basin was renowned in China and abroad for its typical section of Miocene whose thickness is about 20 mm and enriched in animal and plant fossils, it became a natural biology "thesaurus" (Lu Wenfa, 1978). The region has been ranked as fossil palaeontology natural preserve area by the State Department. The Shanwang mulberry fossil sample was excavated in the mine tunnel on the bank of Jiajin river, in the center of the Shanwang basin. Its stratum belongs to the new tertiary SW2 (SW is the abbreviation of Shanwang). The Shanwang stratum consisted of 6 layers. Some scientists thought it was mid-Miocene, whereas according to others' judgements, it belonged to late-Miocene by textual research (Young, C. C., 1936). According to the mine era, the age of Shanwang mulberry fossil was about 14,400,000 years.

DISCUSSION

A mulberry fossil sample was found in Cantal, France early back in 1874 (Schimper, 1874), but it was the first time in China.

There were many mulberry species cultivated near to the Shanwang village, such as Liye dasang, Xiao baotiao, Jian zhizi etc., of which Liye dasang was similar to the Shanwang mulberry. The flower organ of Liye dasang belongs to *M. alba* Linn, and for this reason, it is possible to further infer that the relative species of Shanwang mulberry belongs to *M. alba* Linn.

Since the invention of raising silkworm in China, *M. alba* Linn. has been an important mulberry species for silkworm rearing. According to historical records, *M. alba* Linn. was introduced in Japan by a shaman from Shandong province in Tang dynasty in 680 A. D. (Hotta, T., 1953). It was introduced into Afghanistan, Iran and Italy in 1434 through the Silk Road (Takacchi Y. S., 1952) and into America in 1623 (Takachi, Y. S., 1933). Therefore, the discovery of Shanwang mulberry has added a new page for sericultural civilisation of human beings.

REFERENCES

- HOTTA T., (1953) Mulberry book. Japan provided for worthy published, second edition, p. 38.
 LU WENFA (1978) Biology of fossil thesaurus. China picture, 2.
 SCHIMPER (1874) Traits de paléontologie végétale. Paris Tom, 1-3.
 TAKACHI Y. S. (1933) Talking on rise and down in American sericulture, Japan, Sericologia, 15 : 9.
 TAKACHI Y. S. (1952) Mulberry in cultivation. Published by Japan. Vitalize science. Press p 44.
 KOIDZUMI G., (1917) Taxonomical discussion on *Morus* plant. Japan, Bull. Sericultural examination station, 3 (1) 1-62.
 YOUNG C. C. (1936) A Miocene fossil fishes from Shantung, Bull. Geol. Soc. China 15 : 2.
 The Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences (1985) Mulberry in cultivation of China, Shanghai Science and Technology Press, p 44-48.

DECOUVERTE D'UN FOSSILE DE MURIER ET ETUDES COMPARATIVES AVEC LES ESPECES MODERNES PARENTES

KUAI YUAN ZHANG¹ & WANG BAO ZHONG²

1. The Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang, 212018 - Jiangsu, Chine.
2. Institute of Ancient Organisms Fossil Conservation of Shanwang, Shanwang 500008, Shandong, Chine.

*Les auteurs ont découvert un échantillon de fossile de mûrier dans la mine de Shanwang dans la province de Shandong en 1982. Après l'étude de sa forme et de ses caractères, on a identifié la feuille de mûrier et on l'a nommé mûrier de Shanwang. Par comparaison à l'espèce de mûrier moderne, il appartient à *Morus alba* Linn. Selon la strate de Shawang, on peut le faire remonter à 14 400 000 d'années, à l'époque du milieu ou de la fin du miocène.*

1. Identification du spécimen de fossile de mûrier :

L'échantillon du fossile de mûrier est une feuille entière dont la forme est plus ou moins cordée. La feuille fait 151,8 mm de longueur et 48,24 mm de largeur. L'extrémité de la feuille est caudée et fait 3,5 mm de largeur. Le pétiole fait 57,76 mm de longueur et 3 mm de largeur. La longueur totale de la feuille entière est de 209,56 mm. Le bord est crénelé – dentelé ou dentelé – denticulé avec 34 dentelures sur le côté gauche et 33 sur le côté droit placées au même endroit. La base est tronquée et concave sur un côté. Il y a sept nervures latérales à gauche de la nervure médiane et 6 à droite, c'est à dire que la feuille est pennée. Toutes les nervures latérales bifurquent tandis que les nervures fines forment un réseau. Le pétiole a la forme d'un cylindre sans sillon et stipule, ce qui montre que c'était une feuille adulte. Les caractères principaux de la feuille et des nervations sont similaires à ceux du mûrier, on l'a donc nommé " mûrier Shanwang " et on l'a conservé dans le hall d'exposition de paléontologie de Shanwang, son numéro de collection est 820063 (voir fig.).

2. Comparaison du mûrier Shanwang avec l'espèce homologue de mûrier moderne :

Le mûrier moderne est distribué en Asie, en Amérique Latine, en Amérique du nord, en Afrique, etc. Le genre mûrier comporte 25 espèces et 2 variétés (Koidzumi G., 1917), dont 15 espèces sont distribuées en Chine (Anonyme, 1985). On trouve *Morus alba* Linn, *M. bombycis* Koidzumi et *M. multicaulis* Perr etc. dans la province de Shandong, en Chine. Certaines personnes pensent que *M. multicaulis* Perr. est une variété de *Morus alba* Linn. parce que la forme de sa fleur est semblable et qu'il existe une capacité de croisement entre elles. Le mûrier Shanwang est différent de *M. bombycis* Koidz par contre la forme entière de Shanwang concorde avec celle de *M. alba* Linn. Nous en sommes arrivés à la conclusion, en tenant compte de la relation entre le limbe et le bord de la feuille entre le mûrier Shanwang et *M. alba* Linn. et *M. bombycis* Koidz, que le mûrier Shanwang est une espèce homologue de *M. alba* Linn.

BIBLIOGRAPHIE - BIBLIOGRAPHY

Sériciculture générale	585
General sericulture	
Mûrier	587
Mulberry	
<i>Bombyx mori</i> : élevage, nutrition, pathologie	589
<i>Bombyx mori</i> : rearing, feeding, pathology	
Séricigènes non-mûriers : élevage, nutrition, pathologie	593
Non-mulberry silkworms: rearing, feeding, pathology	
Vers à soie : génétique	595
Silkworms: genetics	
Vers à soie : physiologie, biochimie	599
Silkworms: physiology, biochemistry	
Vers à soie : oeufs, embryologie	605
Silkworms: eggs, embryology	
Vers à soie : glandes séricigènes.	607
Silkworms: silk glands	
Soie	609
Silk	

INDICATIFS DES LANGUES UTILISEES - LANGUAGE SYMBOLS USED

(Bg) Bulgare / <i>Bulgarian</i> .	(C) Chinois / <i>Chinese</i> .
(D) Allemand / <i>German</i> .	(E) Anglais / <i>English</i> .
(F) Français / <i>French</i> .	(J) Japonais / <i>Japanese</i> .
(I) Italien / <i>Italian</i> .	(Pl) Polonais / <i>Polish</i> .
(K) Coréen / <i>Korean</i> .	(R) Russe / <i>Russian</i> .
(Pt) Portugais / <i>Portuguese</i> .	(S) Espagnol / <i>Spanish</i> .
(Ro) Roumain / <i>Rumanian</i> .	

Les lettres minuscules correspondantes sont utilisées pour indiquer la langue du résumé.
The corresponding small letters indicate the language of the abstract.

Sériciculture générale

General sericulture

Ericulture brings prosperity.

BISWAS N.

REC, Diphu, Assam, India.

2003 Indian Silk, Vol. 42(7), 22. (E)

Analysis on game between silk company and sericultural farmer.

CUI Y., MU Z., MU Z.

Forestry College, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China.

2003 Acta Sericologica Sinica, Vol. 29(4), 412-416. (C,e)

Muga grainage : a cover for Khorika.

DULAL GOSWAMI

Research Extension Centre, Regional Muga Research Station, Tura, India.

2003 Indian Silk, Vol. 42(8), 13. (E)

Utilization of mulberry twigs for basket making.

FOTADAR R.K., BINDROO B.B., BISARIA A., KHAN M.A.

RSRS, Miransahib, J&K, India.

2003 Indian Silk, Vol. 42(8), 9-10. (E)

Development of sericulture in Andhra Pradesh.

GOEL A.K., CHANDRASHEKHARAI AH, SESHAGIRI V.

APSSRDI, Kirikera, hindupur, Aandhra Pradesh, India.

2003 Indian Silk, Vol. 42(7), 13-15. (E)

Sericulture in Kishangan. Planning the prosperity.

KIRSUR M.V.,

Indian Silk, CSB, Bangalore, India.

2003 Indian Silk, Vol. 42(8), 25-26. (E)

Development of information management system for sericulture industry.

MIN S., CAO F., ZHOU J.

College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China.

2003 Acta Sericologica Sinica, Vol. 29(4), 449-453. (C,e)

Advantages of naked pupae. A food for thought.

SARATCHANDRA B.

CSB, Bangalore, India.

2003 Indian Silk, Vol. 42(7), 16. (E)

Tasar Ecorace - Bogai : a myth.

SATPATHY B., MOHAN RAO K.

Regional Tasar Research Station, Baripada, Orissa, India.

2003 Indian Silk, Vol. 42(8), 11-12. (E)

Chattisgarh sericulture project: Participation of women groups in development of Tasar culture.

SHAFIQUE AHMED.

CGSP, Bilaspur, Chhattisgarh, India.

2003 Indian Silk, Vol. 42(8), 19-20. (E)

Sericulture practises and future strategies under present scenario of indian subtropics.

SINGHAL B.K., DHAR A., BINDROO B.B., BAKSHI R.L., KHAN M.A.

Regional Sericultural Research Station, Miran Sahib, Jammu- 181 101, Jammu & Dashmir, India.

2003 Int. J. Indust. Entomol., Vol. 7(2), 107-115. (E)

Silk industry in Thailand.

SINHIA R.K., SHETTY K.K.

Central Silk Board, Bangalore, India.

2003 Indian Silk, Vol. 42(8), 21-24. (E)

Mulberry (*Morus alba*) leaves as human food: a new dimension of sericulture.

SRIVASTAVA S., KAPPOR R., THATHOLA A., SRIVASTAVA R.P.

Dept of Foods and Nutrition, C. of Home Sci. Govind Ballabh Plant, US Nagar, Uttaranchal, India.

2003 Int. J. Food Sci. Nutr., Vol. 54(6), 411-416. (E)

Other side of glamarous silk industry.

SUNDAR RAJ S., CHINNASWAMY K.P., BHARATHI V.P.

Department of Sericulture, University of Agricultural Sciences, Bangalore 560 065, Karnataka, India.

2002 Bull. Ind. Acad. Seri., Vol. 6(2), 120-123. (E)

Silkworm genome project and the silk road in the 21th century in China.

XIANG Z.

Zouthwest Agricultural University, Chongqing 400716, China.

2003 Acta Sericologica Sinica, Vol. 29(4), 321-322. (C,e)

Mûrier

Mulberry

Antioxidant role of mulberry (*Morus indica* L. cv. Anantha) leaves in streptozotocin-diabetic rats.

ANDALLU B., VARADACHARYULU N.

2003 *Clin. Chim. Acta*, Vol. 338(1-2), 3-10. (E)

Genetic diversity and relationships in mulberry (genus *Morus*) as revealed by RAPD and ISSR marker assays.

AWASTHI A.K., NAGARAJA G.M., *et al.*

2004 *BMC Genet*, Vol. 5(1), 1. (E)

Fig and mulberry cross-allergy.

CAIAFFA M.F., CATALDO V.M., *et al.*

2003 *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, Vol. 91(5), 493-495. (E)

Effect of ethyl oleate on drying characteristics of mulberries.

DOYMAZ I., PALA M.

Yildiz Technical University, Chemical Engineering Department, 34210 Esenier, Istanbul, Turkey.

2003 *Nahrung*, Vol. 47(5), 304-308. (E)

***Puccinia romagnoliana* Marie and Sacc. - a potential bioherbicide agent for biocontrol of purple nutsedge (*Cyperus rotundus* L.) in mulberry.**

GUPTA V.P., KUMAR V., MISHRA R.K., THIAGARAJAN V., DATTA R.K.

2002 *J. Phytopathology*, Vol. 150(4-5), 263-270. (E)

Mulberroside F isolated from the leaves of *Morus alba* inhibits melanin biosynthesis.

LEE S.H., CHOI S.Y., KIM H., HWANG J.S., LEE B.G., GAO J.J., KIM S.Y.

2002 *Biol. Pharm. Bull.*, Vol. 25(8), 1045-1048. (E)

Myrethecium leaf spot. A major fungal disease of mulberry.

MAJI M.D.

CSR & TI, Berhampore, West Bengal, India.

2003 *Indian Silk*, Vol. 42(8), 7. (E)

North-eastern states : mulberry diseases and their management.

MAJI M.D.

CSR & TI, Berhampore, West Bengal, India.

2003 *Indian Silk*, Vol. 42(7), 7-10. (E)

Meteorological factors in relation to development and prediction of bacterial leaf spot of mulberry (*Morus* sp.)

MAJI M.D., QADRI S.M.H., DAS N.K., PAL S.C.

Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore 741 101, West Bengal, India.

2002 *Bull. Ind. Acad. Seri.*, Vol. 6(2), 107-114. (E)

Ninety-day dietary toxicity study of mulberry leaf extract in rats.

MIYAZAWA M., MIYAHARA C., SATOH S., SAKAI A.

Kanagawa Prefectural Inst. of Public Health: 1-3-, Shimomachiya, Chigasaki-shi, Kanagawa 253-0087, Japan.

2003 *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, Vol. 44(4), 191-197. (J)

Evaluation of some exotic mulberry genotypes for leaf yield and quality.

NINGE GOWDA K.N., SUDHAKAR R.

Department of Sericulture, Bangalore University, Bangalore 500 056, Karnataka, India.

2002 *Bull. Ind. Acad. Seri.*, Vol. 6(2), 39-49. (E)

Post infection physiobiochemical alteration at various intensities of leaf spot (*Myrothecium roridum*) in mulberry.

PRATHEESH KUMAR P.M., QADRI S.M.H., PAL S.C., MISHRA A.K., RAJE URS S.

Central Sericultural Research & Training Institute, Berhampore-742 101, West Bengal, India.

2003 *Int. J. Indust. Entomol.*, Vol. 7(2), 175-180. (E)

Air layering of mulberry for tree plantation.

RAJAN M.V., SRIKANTASWAMY K., CHOUDHURY C.C.

RSRS, Chamarajanagar, India.

2003 *Indian Silk*, Vol. 42(8), 5-6. (E)

Soilborne diseases of mulberry and their management.

SHARMA D.D., NISHITHA NAIK V., CHOWDARY N.B., MALA V.R.

Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore 570 008, Karnataka, India.

2003 *Int. J. Indust. Entomol.*, Vol. 7(2), 93-106. (E)

Structure of two new benzofuran derivatives from the bark of mulberry tree (*Morus macroura* Miq.)

SUN S.G., CHEN R.Y., YU D.Q.

2001 *Journal of Asian Natural Products Research*, Vol. 3(4), 253-259. (E)

Intra and interspecific hybridization studies in mulberry.

TIKADER, RAO A.A.

Central Sericultural Germplasm Resources Centre, Hosur 635 109, Tamilnadu, India.

2002 *Bull. Ind. Acad. Seri.*, Vol. 6(2), 17-22. (E)

Analysis of genetic structure variance among mulberry (*Morus* L.) populations.

YANG G., FENG L., JING C., YU M., XIANG Z.

Key Lab. of Sericulture of Agriculture M., Seric. and Biotech. C., Southwest Agric. Univ., Chongqing 400716, China.

2003 *Acta Sericologica Sinica*, Vol. 29(4), 323-329. (C,e)

Researches on parasitic bees of *Diaphania pyloalis* in Zhejiang province.

YU H., ZHOU Q.

Institute of Applied Entomology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China.

2003 *Acta Sericologica Sinica*, Vol. 29(4), 330-334. (C,e)

***Bombyx mori* : élevage, nutrition, pathologie**

***Bombyx mori* : rearing, feeding, pathology**

Efficacy of neem oil in controlling whitefly and its impact on silkworm rearing.

BANDYOPADHYAY U.K., SANTH KUMAR M.V., DAS K.K., SARATCHANDARA B.
Central Sericultural Research and Training Institute, Berhanmpore 742 101, West Bengal, India.
2002 Bull. Ind. Acad. Seri., Vol. 6(2), 77-84. (E)

Studies on egg production index in some newly evolved multivoltine breeds of the silkworm, *Bombyx mori* L.

GANPOPADHYAY D., SINGH R., PREMALATHA V., RAGHAVENDRA RAO D., et al.
Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore 570 008, Karnataka, India.
2003 Int. J. Indust. Entomol., Vol. 7(2), 117-125. (E)

Effect of improved rearing technology on the main economic cocoon parameters of silkworm *Bombyx mori* L.

GREISS H., TZENOV P.
Agromier Co, 9 Malek El Afdal Str. 11211 Zamalek, Cairo, Egypt.
2002 Bull. Ind. Acad. Seri., Vol. 6(2), 27-33. (E)

Impact of adoption of shoot rearing method.

HIRIYANNA, VIJAYA PRAKASH N.B.
CSR & TI, Mysore, India.
2003 Indian Silk, Vol. 42(7), 11-12. (E)

Post-cocoon traits of silkworm germplasm.

KOUNDINYA P.R., RAYARADDAR F.R., KUMARESAN P., MURTHY T.S.M., SINHA R.K., et al.
SSTL, Kodathi, Bangalore, India.
2003 Indian Silk, Vol. 42(8), 15-18. (E)

Effect of multiple mating on grainage performance of newly evolved bivoltine breeds of *Bombyx mori* L.

KRISHNAPRASAD N.K., SANNAPPA B., VARALAKSHMI R.
Department of Sericulture, UAS, GKVK, Bangalore 560 065, Karnataka, India.
2002 Bull. Ind. Acad. Seri., Vol. 6(2), 50-55. (E)

Heterosis studies in some elite multivoltine silkworm (*Bombyx mori* L.) races with popular bivoltine NB4D2.

KUMARESAN P., SINHA R.K., THANGAVELU K.
Central Sericultural Germplasm Resources Centre, Hosur 635 109, Tamil Nadu, India.
2003 Int. J. Indust. Entomol., Vol. 7(2), 221-229. (E)

Breeding of new germplasms of the silkworm (*Bombyx mori*) resistant to nuclear polyhedrosis or denosonucleosis and identification of RAPD markers linked to the resistant genes.

LI M.W.

2001 Master Paper, Beijing : Chinese Academy of Agricultural Sciences

Food and water utilization patterns in new bivoltine races of silkworm *Bombyx mori* L.

MARIBASHETTY V.G., CHANDRAKALA M.V., AFTAB AHAMED C.A., RAGHURAMAN R.
Karnataka State Sericulture Research and Development Inst., Thalaghattapura, Bangalore 560 062, India.

2002 Bull. Ind. Acad. Seri., Vol. 6(2), 96-102. (E)

Incidence of *Asperillus niger* on viral infected *Bombyx mori*.

MISRA MS., RAJA GOPAL REDDY C., PRASAD V.S., CHANDRASEKHARAI AH, VINEELA D.

Andhra Pradesh State Sericulture Research & Development Institute, Kirikera 515 211, Hindupur, (AP) India.

2002 Bull. Ind. Acad. Seri., Vol. 6(2), 23-26. (E)

Relation among food consumption, conversion and cocoon production in silkworm, *Bombyx mori* L. reared at different temperatures.

MUNIRAJU E., SHEKHARAPPA B.M., RAGHURAMAN R.

Karnataka State Sericulture Research and Development Inst., Thalaghattapura, Bangalore 560 062, Karnataka, India.

2003 Int. J. Indust. Entomol., Vol. 7(2), 203-208. (E)

Appropriate selection of hybrids of silkworm (*Bombyx mori* L.) through heterosis breeding for rearing traits.

NARAYANASWAMY T.K., ANANTHANARAYANA S.R., GOVINDAN R., RAMESH S.

Department of Sericulture, U.A.S., GK VK, Bangalore 560 065, Karnataka, India.

2002 Bull. Ind. Acad. Seri., Vol. 6(2), 34-38. (E)

Grainage performance of intra-racial crosses of pure mysore race of the silkworm *Bombyx mori* L.

NARAYANASWAMY T.K., CHANDRAPPA P.L., SRINIVASAGOWDA R., HADIMANI M.B., *et al.*

University of Agricultural Sciences, GKVK, Bangalore 560 056, Karnataka, India.

2002 Bull. Ind. Acad. Seri., Vol. 6(2), 115-116. (E)

Development of an automated warehouse type silkworm rearing system for the production of useful materials.

OHURA M.

Lab. of Mass Production System, Nat. Institute of Agrobiological Science, Owashi 1-2, Tsukuba, Ibaraki 305-8634, Japan.

2003 Journal of Insect Biotechnology and Sericology, Vol. 72(3), 163-169. (E)

Studies on multiple sampling plan of the pebrine inspection for the silkworm's mother moth.

PAN S., QI L., PAN L., PENG H.

Xuzhou Normal University, Xuzhou 221009, China.

2003 Acta Sericologica Sinica, Vol. 29(4), 407-411. (C,e)

How silkworms protect themselves ?

PATIL C.S., JAMUNA B.R.

Karnataka State Sericulture Research and Development Inst., Thalaghattapura, Bangalore 520 062, India.

2002 *Bull. Ind. Acad. Seri.*, Vol. 6(2), 117-119. (E)

Presence of *Wolbachia* endosymbionts in different silkworm species and races and in their uzi fly parasites.

PUTTARAJU H.P., MADHU M.

2002 *J. Invert. Pathol.*, Vol. 79(2), 120-122. (E)

Expression of heterosis in relation to food utilization in the newly evolved bivoltine races of silkworm, *Bombyx mori* L.

RADHAKRISHNA P.G., SEKHARAPPA B.M., SHIVAKUMAR C.

Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Bangalore, 560062, India.

2002 *Bull. Ind. Acad. Seri.*, Vol. 6(2), 85-90. (E)

Studies on manifestation of hybrid vigour in F1 and three-way crosses of multivoltine x bivoltine silkworm, *Bombyx mori* L.

RAGHAVENDRA RAO D., BANERJEE S., KARIAPPA B.K., SINGH R., and *al.*

Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore 570 008, Karnataka, India.

2003 *Int. J. Indust. Entomol.*, Vol. 7(2), 209-219. (E)

Effect of Antibiotic (norfloxacin) administration on commercial characters of new bivoltine and cross breed hybrid silkworm (*Bombyx mori* L.)

RAHMATHULLA V.K., NAYAK P., VINDYA G.S., HIMANTHARAJ M.T., RAJAN R.K.

Central Sericultural and Training Institute, Mysore 570 008, India.

2003 *Int. J. Indust. Entomol.*, Vol. 7(2), 191-195. (E)

Adaptability Comparison of the *Bombyx mandarina* moore and *Bombyx mori* L. to the environment.

SHEN W., LI B., JI P., WEI Z., CHEN Y., PANG G.

College of Agricultural Science and Technology, Soochow University, Suzhou 215006, China.

2003 *Acta Sericologica Sinica*, 29(4), 375-379. (C,e)

Investigation of resistance against the pebrine disease for resources of the silkworm, *Bombyx mori*.

SHEN Z., XU L., XU A., LI M., ZHANG Y., HOU C.

The Sericulture Research Institute, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Zhenjiang 212018, China.

2003 *Acta Sericologica Sinica*, Vol. 29(4), 421-426. (C,e)

Effect of feeding tukra infested mulberry leaves on quantitative characters of the mulberry silkworm, *Bombyx mori* L.

SINGH R., RAGHAVENDRA RAO D., KARIAPPA B.K., JAYASWAL K.P.

Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore 570 008, Karnataka, India.

2002 *Bull. Ind. Acad. Seri.*, Vol. 6(2), 91-95. (E)

Studies on insect microsporidia resources in Guangdong province and Cross infection among some insects.

ZHENG X., YANG Q., FANG D., LIAO S., ZOU Y., HUANG B.

Sericulture Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510610, China.

2003 *Acta Sericologica Sinica*, Vol. 29(4), 380-293. (C,e)

Séricigènes non-mûriers : élevage, nutrition, pathologie

Non-mulberry silkworms: rearing, feeding, pathology

Growth and development of muga silkworm fed on different food plants.

DAS K., DAS R.

CMERTI, Jorhat, Assam, India.

2003 Indian Silk, Vol. 42(7), 19-21. (E)

Frequency occurrence of nature grown raily ecorace *Antheraea mylitta* D. in different food plants in bastar forest division in Chhattisgarh, India.

MAHOBIA G.P., PANDE V.K., SINHA B.R.R.P.

Regional Tasar Research Station, Jagdalpur 494005, Chhattisgarh, India.

2002 Bull. Ind. Acad. Seri., Vol. 6(2), 56-60. (E)

Biodiversity of tasar fauna and its flora.

NAIKA R., GOWDA M., NARAYANASWAMY K.C., NAGESHCHANDRA B.K.

Sericulture College, University of Agriculture Science, Chintamani 563 125, Karnataka, India.

2002 Bull. Ind. Acad. Seri., Vol. 6(2), 1-8. (E)

Low cost incubator for *Antheraea mylitta* eggs : efficacy of the devices.

RAHT S.S., NEGI B.B.S., SINHA B.R.R.P., THANGAVELU K.

Central Tasar Research and Training Institute, Nagari, Ranchi 835 303, Jharkhand, India.

2002 Bull. Ind. Acad. Seri., Vol. 6(2), 61-66. (E)

Vers à soie : génétique

Silkworms : genetics

Characterization of late gene expression factors lef-9 and lef-8 from *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus.

ACHARYA A., GOPINATHAN K.P.

2002 *J. Gen. Virol.*, Vol. 83(8), 2015-2023. (E)

cDNA libraries construction and large-scale ESTs sequencing of the silkworm.

CHENG D., XIA Q., ZHOU Z., LU C., XIANG Z.

Key Sericultural Lab. of the Agric. M., Seric. and Biotech. C., Southwest Agricultural Univ., Chongqing 400716, China.

2003 *Acta Sericologica Sinica*, Vol. 29(4), 335-339. (C,e)

Expression profiling of homeobox genes in silk gland development in the mulberry silkworm *Bombyx mori*.

DHAWAN S., GOPINATHAN K.P.

Department of Microbiology and Cell Biology, Indian Institute of Science, 560012, Bangalore, India.

2003 *Dev. Genes Evol.*, Vol. 213(11), 523-533. (E)

Comparison of gene representation in midguts from two phytophagous insects, *Bombyx mori* and *Ips pini*, using expressed sequence tags.

EIGENHEER A.L., KEELING C.I., YOUNG S., TITTIGER C.

Department of Biochemistry 330, University of Nevada, Reno 89557, Reno, NV, USA.

2003 *Gene*, Vol. 316, 127-136. (E)

Nucleotide sequences of segments 1, 3 and 4 of the genome of *Bombyx mori* cypovirus 1 encoding putative capsid proteins VP1, VP3 and VP4, respectively.

HAGIWARA K., RAO S.J., SCOTT S.W., CARNER G.R.

2002 *J. Gen. Virol.*, Vol. 83(6), 1477-1482. (E)

Comparison of promoter activity of the p10 gene between *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus variants.

HYE K.H., JAE Y.C., SOO D.W., HAE K.L., YEON H.J.

2001 *J. Microbiology and Biotechnology*, Vol. 11(4), 575-591. (E)

Targeted gene expression using the GAL4/UAS system in the silkworm *Bombyx mori*.

IMAMURA M., NAKAI J., *et al.*

2003 *Genetics*, Vol. 165(3), 1329-1340. (E)

Tandem duplication of alkaline phosphatase genes and polymorphism in the intergenic sequence in *Bombyx mori*.

ITO H., INOUE T., KANAMORI Y., NISHIDA S., YAMAGUCHI M.

Dept of Applied Biology, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Sakyo, 606-8585, Kyoto, Japan;

2003 *Mol. Genet Genomics*, Vol. 270(2), 114-120. (E)

Characterization of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus or f68 gene that encodes a novel structural protein of budded virus.

IWANAGA M., KURIHARA M., KOBAYASHI M., KANG W.K.

2002 *Virology*, Vol. 297(1), 39-47. (E)

De novo gene expression and antisense inhibition in cultured cells of BmTRN-1, cloned from the midgut of the silkworm, *Bombyx mori*, which is homologous with mammalian TIA-1/R.

KOTANI E., OHBA T., NIWA T., STOREY K.B., STOREY J.S., HARA S., SAITO H., *et al.*

Department of Applied Biology, Kyoto Institute of Technology, 606-0962, Sakyo, Japan;

2003 *Gene*, Vol. 320, 67-79. (E)

The expression of GFP under the control of fibroin promotor in primary ovarian cells of *Antheraea pernyi*.

LI W., JIN L., *et al.*

2003 *J. Biosci.*, Vol. 28(6), 691-695. (E)

Cloning of a putative *Bombyx mori* TFIIB-related factor (BRF).

MARTINEZ M.J., SPRAGUE K.U.

Department of Chemistry, University of Oregon, Eugene, Oregon 97403-1229, USA.

2003 *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, Vol. 54(2), 55-67. (E)

The construction of an EST database for *Bombyx mori* and its application.

MITA K., MORIMYO M., OKANO K., KOIKE Y., NOHATA J., KAWASAKI H., *et al.*

Lab. of Insect Genome, Nat. Inst. of Agrobiol. Sci., Owashi 1-2, Tsukuba, Ibaraki 305-8634, Japan.

2003 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (in press).

Analysis of extrachromosomal homologous recombination in cultured silkworm cells.

MON H., KUSAKABE T., *et al.*

2003 *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol. 312(3), 684-690. (E)

Silkworm 5S RNA and alanine tRNA genes share highly conserved 5' flanking and coding sequences.

MORTON D.G., SPRAGUE K.U.

Institute of Molecular Biology and Biology Department, Univ. of Oregon, Eugene, Oregon 97403, USA.

1982 *Mol. Cell Biol.*, Vol. 2(12), 1524-1531. (E)

Molecular characterization of a cDNA from the silk moth *Bombyx mori* encoding *Manduca sexta* allatotropin peptide.

PARK C., HWANG J.S., KANG S.W., LEE B.H.

2002 *Zoological Science*, Vol. 19(3), 287-292. (E)

Study on the comparison of sequence similarity of three *Nosema bombycis* geographical strains.

SHI L., QIU B., GAO H.

Scientific and Technological College of Shandong Agriculture University, Taian 271018, China.

2003 *Acta Sericologica Sinica*, Vol. 29(4), 384-386. (C,e)

Baculovirus-mediated efficient gene transfer into the central nervous system of the silkworm, *Bombyx mori*.

SHIOMI K., KAJIURA Z., NAKAGAKI M., YAMASHITA O.

Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu Univ., Ueda, Nagano 386-8567, Japan.

2003 *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, Vol. 72(3), 149-155. (E)

The DNA binding of insect fork head factors is strongly influenced by the negative cooperation of neighbouring bases.

TAKIYA S., GAZI M., MACH V.

Cent. for Adv. Science and Technology, Grad. Sch. of Env. Earth Sci., Hokkaido Univ., Kita-ku, Sapporo 060-0810, Japan.

2003 *Insect Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 33(11), 1145-1154. (E)

Characterization and transcriptional profiles of three *Spodoptera frugiperda* genes encoding cysteine-rich peptides. A new class of defensin-like genes from lepidopteran insects ?

VOLKOFF A.N., ROCHER J., D'ALENCON E., BOUTON M., LANDAIS I., *et al.*

Laboratoire de Pathologie Comparée, UMR 5087 INRA-CNRS/Université Montpellier II, 30380 SAINT CHRISTOL LES ALES, France.

2003 *Gene*, Vol. 319, 43-53. (E)

Cloning and sequence analysis of iap1 gene of *Bombyx mori* nuclear polyhedrovirus ZJ strain and its function on regulating NF- κ B activity in mammalian cells.

WU J., LIM R.W., WU X., SUN G.Y., LU H.

College of Biotechnology, East China Shipbuilding Institute, Zhenjiang 212018, China.

2003 *Acta Sericologica Sinica*, Vol. 29(4), 359-364. (E,c)

Identification of three annexin IX isoforms generated by alternative splicing of the carboxyl-terminal exon in silkworm, *Bombyx mori*.

XIA Q., FUJII H., KUSAKABE T., BANNO Y.

2001 *Insect Biochem. & Mol. Biol.*, Vol. 32(1), 9-14. (E)

The gene of VP28 gene from prawn white spot syndrome virus in silkworm, *Bombyx mori*.

XU Y., XY Z., SHEN W., WU X., GONG C.

College of Animal Science, Zhenjiang University, Hangzhou 310029, China.

2003 *Acta Sericologica Sinica*, Vol. 29(4), 365-368. (C,e)

Vers à soie : physiologie, biochimie

Silworms: physiology, biochemistry

Juvenile hormone stimulated tyrosine kinase-mediated protein phosphorylation in the CNS of the silkworm, *Bombyx mori*.

ARIF A., SHANAVAS A., MURTHY C.R.K., DUTTA-GUPTA A.
2002 *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, Vol. 50(3), 139-146. (E)

Inhibition of human cell apoptosis by silkworm hemolymph.

CHOI S.S., RHEE W.J., PARK T.H.
2002 *Biotechnology Progress*, Vol. 18(4), 874-878. (E)

Molecular cloning and expression pattern of an armadillo homologue from the mulberry silkworm *Bombyx mori*.

DHAWAN S., GOPINATHAN K.P.
2004 *Gene Expr. Patterns*, Vol. 4(1), 15-23. (E)

Biological characteristics of moon silkworm *Actias selene* Hübner and identification of its vitellogenin.

DONG S., LIU C., WANG T., ZHU B.
Department of Sericulture, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China.
2003 *Acta cSinica*, Vol. 29(4), 439-442. (C,e)

Antiviral potential of the silkworm deoxynojirimycin against hepatitis B virus.

EUN YOU J., SEONG S.II., KIM Y.H.
Department of Life Science, College of Natural Sciences, The University of Suwon, Suwon, 445-743, Korea.
2003 *Int. J. Indust. entomol.*, Vol 7(2), 139-144. (E)

Study on effect of N-carboxymethylchitosan on detached mulberry leaves and silkworm physiology.

GAO H., MU Z., MIN W., LI H.
Sericulture Department of Forestry College, Shangdong Agricultural University, Taian 271018, China.
2003 *Acta Sericologica Sinica*, Vol. 29(4), 387-390. (C,e)

Distribution of cuticular protein mRNAs in silk moth integument and imaginal discs.

GU S., WILLIS J.H.
Department of Cellular Biology, University fo Georgia, 30602, Athens, GA, USA.
2003 *Insect Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 33(12), 1177-1188. (E)

The physical methods for induction of anti-bacterial substances in the silkworm larva, *Bombyx mori*.

GUI Z., DAI J., SHUANG D.

Sericultural Research Inst., Chinese Acad. of Agric. Sci., Zhenjiang 212018, Jiangsu, China.

2003 *Int. J. Indust. Entomol.*, Vol. 7(2), 231-233. (E)

Regulation of glutamine metabolism during the development of *Bombyx mori* larvae.

HIRAYAMA C., NAKAMURA M.

2002 *Biochim. Biophys. Acta General Subjects*, Vol. 1571(2), 131-137. (E)

A silkworm larvae plasma test for detecting peptidoglycan in cerebrospinal fluid is useful for the diagnosis of bacterial meningitis.

INADA K., TAKAHASHI K., ICHINOHE S., SUDA H., TSUCHIYA M., et al.

Department of Microbiology, School of Medicine Iwate Medical University.

2003 *Microbiol. Immunol.*, Vol. 47(10), 701-707. (E)

Ethyl 4-(2-(6-methyl-3pyridyloxy)butyloxy) benzoate, a novel anti-juvenile hormone agent.

ISHIGURO H., FUJITA N., KIM I.H., SHIOTSUKI T., KUWANO E.

Lab. of Pesticide Chemistry, Dept. of Applied Genetics and Pest Manag., Fac. of Agric., Kyushu Univ., Fukuoka, Japan.

2003 *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, Vol. 67(9), 2045-2047. (E)

Silkworm larvae as an animal model of bacterial infection pathogenic to humans.

KAITO C., AKIMITUS N., WATANABE H., SEKIMIZU K.

2002 *Microbial Pathogenesis*, Vol. 32(4), 183-190. (E)

Fluctuation of the ploidy level in the epidermis of *Bombyx mori* during the penultimate and ultimate larval instars.

KAWASAKI H., NISHIDA S., KANKE E.

2001 *Invertebrate Reproduction and Development*, Vol. 40(2-3), 109-116. (E)

Isolation and purification of polyhydroxylated alkaloids from silkworm (*Bombyx mori* L.)

KIM H.S., KO H.J., CHO Y.S., LEE J.Y., HWANG K.Y., et al.

Biotopia Co., Ltd. Hwasung city, Kyounggido 445-743, Korea.

2003 *Int. J. Indust. Entomol.*, Vol. 7(2), 161-164. (E)

Immune stimulation in the silkworm, *Bombyx mori* L., by CpG oligodeoxynucleotides.

KIM I., KIM S.H., et al.

2004 *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, Vol. 55(1), 43-48. (E)

Possible presense of an interleukin-6-like molecule in the immunized *Bombyx mori* L. (Lepidoptera).

KIM I., LEE Y.S., LEE J.H., KIM S.H., KANG P.D., LEE I.H., KIM J.W., et al.

Departement of Sericulture and Entomology, The National Inst. of Agric. Sci. & Tech., RDA Suwon 441-100, Korea.

2003 *Int. J. Indust. Entomol.*, Vol. 7(2), 165-173. (E)

Purification and identification of flavonoids from the yellow green cocoon shell (Sasamayu) of the silkworm, *Bombyx mori*.

KURIOKA A., YAMAZAKI M.

2002 *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, Vol. 66(6), 1396-1399. (E)

Evolution of the small heat-shock proteins in class of insect.

LI B., XIA Q., SUN W., LU C., ZHOU Z.

The Key Sericultural Lab. of Agric. M., Seric. and Biotech. C., Southwest Agricultural Univ., CHongqing 400716, China.

2003 *Acta Sericologica Sinica*, Vol. 340-343. (C,e)

Classification of larval circulating hemocytes of the silkworm, *Bombyx mori*, by acridine orange and propidium iodide staining.

LING E., SHIRAI K., KANEKATSU R., KIGUCHI K.

Lab. of Silkworm Phys., Dept of Applied Biol., Fac of Textile Sci. & Tech., Shinshu Univ., Ueda 386-8567, Nagano, Japan.

2003 *Histochem. Cell. Biol.*, (in press)

Mulberry silkworm, *Bombyx mori* L., as a host for neurotoxic braconidae I. Insect-toxic properties of bracon venom gland extract and its fractions.

MADYAROV S.R., MIRZAEVA G.S., OTARBAEV D.O., KHAMIDI K.S., et al.

Inst. of Physiology and Biophysics, Uzbek Academy of Sciences (UZAS), 1, Niyazov street, 700095, Tashkent, Uzbekistan.

2003 *Int. J. Indust. Entomol.*, Vol. 7(2), 235-239. (E)

Changes in protein and reducing sugar content of the haemolymph during V instar development of *Bombyx mori* L.

MAHADEV KUMAR, SOWRI D., SARANGI S.K.

Department of Sericulture, Bangalore University, Jnana Bharathi, Bangalore 560 056, Karnataka, India.

2002 *Bull. Ind. Acad. Seri.*, Vol. 6(2), 103-106. (E)

¹H, ¹³C and ¹⁵N backbone assignments of the pheromone binding protein from the silk moth *Antheraea polyphemus* (ApolPBP).

MOHANTY S., ZUBKOV S., CAMPOS-OLIVAS R.

2003 *J. Biomol. NMR.*, Vol. 27(4), 393-394. (E)

Physiological differentiation of DH-PBAN-producing neurosecretory cells in the silkworm embryo.

MORITA A., NIIMI T., et al.

2003 *J. Insect Physiol.*, Vol. 49(12), 1093-1102. (E)

In vitro studies of hematopoiesis in the silkworm : cell proliferation and hemocyte discharge from the hematopoietic organ.

NAKAHARA Y., KANAMORI Y., KIUCHI M., KAMIMURA M.

National Institute of Agrobiological Sciences, 1-2 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8634, Japan.

2003 *J. Insect Physiol.*, Vol. 49(10), 907-916. (E)

Aminopeptidase N isoforms from the midgut of *Bombyx mori* and *Plutella xylostella* - their classification and the factors that determine their binding specificity to *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin.

NAKANISHI K., YAOI K., NAGINO Y., HARA H., KITAMI M., ATSUMI S., MIURA N., et al.

2002 *FEBS Letters*, Vol. 519(1/3), 215-222. (E)

Spontaneous synthesis of an antibacterial peptide linked to ecdysis in lepidopteran insects.

NAKAZAWA H., YUKUHIRO F., FURUKAWA S., et al.

Innate Immunity Lab. and Insect Life-Cycle and Physiology Lab., Nat. Inst. of Agro., Tsukuba, Ibaraki 305-8634, Japan.

2003 *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, Vol. 72(3), 133-137. (E)

Biosynthesis of nonessential amino acids and the urea-cycle in silkworms.

OSANAI M., OKUDAIRA M.

2001 *Tanpakushitsu Kakusan Koso. Protein, Nucleic Acid, Enzyme*, Vol. 46(6), 733-740.**Leucine methyl ester is a powerful allosteric activator of the neutral amino acid cotransport system in *Bombyx mori* larval midgut.**PARENTI P., LEONARDI M.G., FORCELLA M., CASARTELLI M., PUGLIESE A., *et al.*2002 *Insect Biochem. and Mol. Biol.*, Vol. 32(7), 719-727. (E)**Activation and inhibition of the transduction process in silk moth olfactory receptor neurons.**

POPHOF B., GOE VAN NATERS V.

2002 *Chemical Senses*, Vol. 27(5), 435-443. (E)**Analysis of heterosis of 18 biochemical characters in haemolymph metabolism of silkworm.**

REN M., HUA W.

Jiangsu Television University, Nanjing 210013, China.

2003 *Acta Sericologia Sinica*, Vol. 29(4), 417-420. (C,e)**Flow cytometric analysis of the effect of silkworm hemolymph on the baculovirus-induced insect cell apoptosis.**

RHEE A., JONG W., PARK T.H.

2001 *J. Microbiol. & Biotechnol.*, Vol. 11(5), 853-857. (E)**Silkworm hemolymph as a potent inhibitor of apoptosis in Sf9 cells.**

RHEE W.J., KIM E.J., PARK T.H.

2002 *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol. 295(4), 770-783. (E)**Interaction among silkworm ribosomal proteins P1, P2 and P0 required for functional protein binding to the GTPase-associated domain of 28S rRNA.**

SHIMIZU T., NAKAGAKI M., NISHI Y., KOBAYASHI Y., HACHIMORI A., UCHIUMI T.

2002 *Nucleic Acids Research*, Vol. 30(12), 2620-2627. (E)**Protein purification, cDNA cloning and characterization of a protease inhibitor from the Indian tasar silkworm, *Antheraea mylitta*.**

SHRIVASTAVA B., GHOSH A.K.

Department of Biotechnology, Indian Institute of Technology, Kharagpur-721302, West Bengal, India.

2003 *Insect Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 33(10), 1025-1033. (E)**Comparative study on *Trichoplusia ni* Tn 5B1-4 cells and *Bombyx mori* BmN cells for recombinant endostatin production.**

SOHN B.H., LEE J.M., KANG P.D., LEE S.U., KIM Y.S., CHUNG I.S.

Department of Sericulture and Entomology, The National Inst. of Agric. Sci. and Tech., RDA, Suwon 441-100, Korea.

2003 *Int. J. Indust. Entomol.*, Vol. 7(2), 197-201. (E)**The ecdysone regulatory cascade and ovarian development in lepidopteran insects: insights from the silkworm paradigm.**

SWEVERS L., IATROU K.

2003 *Insect Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 33(12), 1285-1297. (E)

Regulation of prothoracic gland ecdysteroidogenic activity leading to pupal metamorphosis.

TAKAKI K., SAKURAI S.

Div. of Life Sciences, Graduate S. of Sci. and Techn., Kanazawa Univ., Kakumamachi, 920-11292, Kanazawa, Japan.

2003 *Insect Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 33(12), 1189-1199. (E)

Purification and characterization of nucleoside diphosphate kinase from the brain of *Bombyx mori*.

UNO T., UENO M., KIKUCHI M., AIZONO Y.

2002 *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, Vol. 50(3), 147-155. (E)

Insect juvenile hormone enhancing gene expression in silkworm baculovirus vector system.

WANG H.W., ZHANG Z.F., XIAO Q.L., LI W.G., HE J.L.

2001 *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, Vol. 17(5), 590-593. (C)

A *Bombyx mori* transcription factor, ATF C binds directly to the UPRE of molecular chaperones.

WON GOO T., YOUNG YUN E., WAN KIM S., HO CHOI K., *et al.*

Department of Sericulture and Entomology, National Inst. of Agric. Sci. and Tech., R.D.A., Suwon 441-100, Korea.

2003 *Int. J. Indust. Entomol.*, Vol. 7(2), 133-137. (E)

Baculovirus expression and biochemical characterization of the *Bombyx mori* protein disulfide isomerase (bPDI).

WON GOO T., YOUNG YUN E., WAN KIM S., HO CHOI K., *et al.*

Department of Sericulture and Entomology, National Inst. of Agric. Sci. & Tech., R.D.A., Suwon 441-100, Korea.

2003 *Int. J. Indust. Entomol.*, Vol. 7(2), 127-131. (E)

Studies on preparation of chitin from silkworm puparia and crystal structure of microcrystalline chitin.

WU J., XIE L.

Department of Chemical Engineering of Jiaying College, Jiaying 314001, China.

2003 *Acta Sericologica Sinica*, Vol. 29(4), 399-403. (C,e)

Ultrastructural studies on the pheromone-producing cells in the silkworm, *Bombyx mori*: formation of cytoplasmic lipid droplets before adult eclosion.

YOKOYAMA N., FONAGY A., *et al.*

2003 *Acta Biol. Hung.*, Vol. 54(3-4), 299-311. (E)

Molecular cloning of a cDNA encoding putative apolipoprotein from the silkworm, *Bombyx mori*.

YOUNG YUN E., WON GOO T., WAN KIM S., *et al.*

Department of Sericulture and Entomology, The National Inst. of Agric. Sci. and Tech., Suwon 441-100, Korea.

2003 *Int. J. Indust. Entomol.*, Vol. 7(2), 145-149. (E)

Hypoglycemic activity of the decoction of cocoon shell on alloxan-diabetic model mice.

ZHAN Y., HUANG C., CHEN G.

Department of Sericulture, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China.

2003 *Acta Sericologica Sinica*, Vol. 29(4), 446-448. (C,e)

Effects of the antibacterial peptide cecropins from Chinese oak silkworm, *Antheraea pernyi* on 1, 2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in rats.

ZHANG W.M., LAI Z.S., HE M.R., XU G., HUANG W., ZHOU D.Y.

Inst. of Digestive Diseases of PLA, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China.

2003 *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, Vol. 23(10), 1066-1068. (C)

Study on the strain and individual polymorphism of Chymotrypsin inhibitors in haemolymph of silkworm, *Bombyx mori*.

ZHAO P., XIA Q., HIROSHI F., YUTAKA B.

The Key Sericultural Lab. of Agricultural M., Southwest Agric. Univ., Chongqing 400716, China.

2003 *Acta Sericologica Sinica*, Vol 29(4), 349-354. (C,e)

Preparation of silkworm protein using two dimensional polyacryamide gel electrophoresis.

ZHONG B., YAN H., SHEN F., LI J., ZHOU L.

Lab. of Molecular Biology of Silkworm and Honeybee, College of Animal Science, Zhenjiang Univ., Hangzhou 310029, China.

2003 *Acta Sericologica Sinica*, Vol. 29(4), 427-432. (C,e)

Foreign insect hormones stimulating the transcription of the ie-1 promoter of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus in vivo and in vitro.

ZHOU Y.J., XIAO Q.L., ZHANG Z.F., HE H.L., ZHANG Y.X.

2002 *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, Vol. 66(7), 1488-1494. (E)

Preliminary study of colleterial glands and its secretion in the silkworm, *Bombyx mori*.

ZHU B., LIU C., DONG S., HU X., WANG J.

Department of Sericulture, Anhui Agriculture University, Hefei 230036, China.

2003 *Acta Sericologica Sinica*, Vol. 29(4), 436-438. (C,e)

Study on apoptosis of BmN cells induced by CdCl₂.

ZHU Y., ZHU J.

College of Life Sciences, Soochow University, Suzhou 215006, China.

2003 *Acta Sericologica Sinica*, Vol. 29(4), 433-435. (C,e)

Vers à soie : oeufs, embryologie

Silkworms: eggs, embryology

A study of the complex of proteolytic enzymes and their protein inhibitors in embryogenesis of the silkworm.

IARYGIN D.V., KLUNOVA S.M., FILIPPOVICH B.
2001 *Ontogenez*, Vol. 32(4), 269-276. (E)

Incidence of mutation in the silkworm larvae from the eggs irradiated by heavy ion beams.

KOTANI E., FURUSAWA T., NAGAOKA S., ICHIDA S., SUGIMURA M., *et al.*
2001 *Uchu Seibutsu Kagaku*, Vol. 15(3), 268-269.

Researches of yolk and hemolymph proteins in the miniature egg mutant of silkworm, *Bombyx mori*.

LIN Y., ZHAO P., HOU Y., DAI F., XIA Q.
The Key Sericultural Lab. of Agricultural M., Southwest Agricultural Univ., Chongqing 400716, China.
2003 *Acta Sericologica Sinica*, Vol. 29(4), 355-358. (C,e)

Roles of actin networks in peristaltic squeezing of sperm bundles in *Bombyx mori*.

SAHARA K., KAWAMURA N.,
2004 *J. Morphol.*, Vol. 259(1), 1-6. (E)

The ecdysone regulatory cascade and ovarian development in lepidopteran insects: insights from the silkworm paradigm.

SWEVERS L., IATROU K.
Inst. of Biology, National Centre for Scientific Research "Demokritos", Aghia Paraskevi Attikis, 15310, Athens, Grece.
2003 *Insect Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 33(12), 1285-1297. (E)

Study of the phenomenon of semi-active embryo in silkworm, *Bombyx mori*.

XU S., CHEN X., SIMA Y.
School of Agriculture Science and Technology, Soochow University, Suzhou 215006, China.
2003 *Acta Sericologica Sinica*, Vol. 29(4), 369-374. (C,e)

Vers à soie : glandes séricigènes

Silkworms : silk glands

Assembly of the silk fibroin elementary unit in endoplasmic reticulum and a role of L-chain for protection of alpha 1,2-mannose residues in N-linked oligosaccharide chains of fibrohexamerin/P25.

INOUE S., TANAKA K., *et al.*

2004 *Eur. J. Biochem.*, Vol. 271(2), 356-366. (E)

Silk formation mechanisms in the larval salivary glands of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae).

SILKVA-ZACARIN E.C., SILVA DE MORAES R.L., *et al.*

2003 *J. Biosci.*, Vol. 28(6), 753-764. (E)

The relation between the protein composition of posterior silk glands in the fifth instar larva of silkworm and cocoon shell weights.

YAN X., ZHONG B., XU M., GUO D., YAO G.

Lab. of Molecular Biology of Silkworm and Honeybee, C. of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China.

2003 *Acta Sericologica Sinica*, Vol. 29(4), 344-348. (C,e)

Copper in the silk formation process of *Bombyx mori* silkworm.

ZHOU L., CHEN X., SHAO Z., ZHOU P., KNIGHT D.P., VOLLRATH F.

Department of Macromolecular Science, The Key Lab of Mol. Engin. of Polymers, Fudan Univ. 200433, Shanghai, PR China.

2003 *FEBS Letters*, Vol. 554(3), 337-341. (E)

Soie

Silk

Silk matrix for tissue engineered anterior cruciate ligaments.

ALTMAN G.H., HORAN R.L., LU H.H., MOREAU J., MARTIN I., RICHMOND J.C., KAPLAN D.

2002 *Biomaterials*, Vol. 23(20), 4131-4141. (E)

Quality control of silk.

ANYING X., LONG L.

Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agric. Sci., Zhenjiang, Jiangsu, China.

2003 *Indian Silk*, Vol. 42(7), 26-28. (E)

The role of irregular unit, GASS, on the secondary structure of *Bombyx mori* silk fibroin studied with C13 CP/MAS NMR and wide-angle X-ray scattering.

ASAKURA T., SUGINO R., OKUMURA T., NAKAZAWA Y.

2002 *Protein Science*, Vol. 11(8), 1873-1877. (E)

Production and characterizaiton of a silk-like hybrid protein, based on the polyalanine region of *Samia cynthia ricini* silk fibroin and a cell adhesive region derived from fibronectin.

ASAKURA T., TANAKA C., YANG M., YAO J., KUROKAWA M.

Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Kogane, 184-8588, Tokyo, Japan.

2004 *Biomaterials*, Vol. 25(4), 617-624. (E)

Hetereogeneous structure of silk fibers from *Bombyx mori* resolved by C13 solid-state NMR spectroscopy.

ASAKURA T., YAO J.M., YAMANE T., UMEMURA K., ULTRICH A.S.

2002 *J. American Chemical Soc.*, Vol. 124(30), 8794-8795. (E)

Mapping domain structures in silks from insects and spiders related to protein assembly.

BINI E., KNIGHT D.P., *et al.*

2004 *J. Mol. Biol.*, Vol. 335(1), 27-40. (E)

Fibroin-like substance is a major component of the outer layer of fertilization envelope via which carp egg adheres to the substratum.

CHANG Y.S., HUANG F.L.

2002 *Molecular Reproduction and Development*, Vol. 62(3), 397-406. (E)

Graft reactivity of diethylene glycol dimethacrylate onto silk fibers.

CHEN G.Q., XING T.L., HUANG C.R., ZHOU X.

2002 *Acta Chimica Sinica*, Vol. 60-6), 1106-1110. (E)

Human bone marrow stromal cell and ligament fibroblast responses on RGD-modified silk fibers.

CHEN J., ALTMAN G.H., KARAGEORGIOU V., HORAN R., COLLETTE A., *et al.*
Tufts University, Dept. of Chemical and Biological Engineering, Medford, Massachusetts 02155, USA.
2003 J. Biomed. Mater. Res., Vol. 67A(2), 559-570. (E)

Studies on properties of sericin protein of *Bombyx mori*. Part I : Dissolution behavior of cocoon filament sericin in pure water and solution of sodium dodecyl sulphate (SDS).

CHEN W., YOU Q.
College of Materials and Textiles, Zhejiang Inst. of Science and Technology, Hangzhou, 310033, P.R. China.
2002 Bull. Ind. Acad. Seri., Vol. 6(2), 9-16. (E)

Degumming of silk fabric with several proteases.

FREDDI G., MOSSOTTI R., *et al.*
2003 J. Biotechnol., Vol. 106(1), 101-112. (E)

Preparation and characterization of conjugates of silk fibroin and chitooligosaccharides.

GOTOH Y., MINOURA N., MIYASHITA T.
2002 Colloid and Polymer Science, Vol. 280(6), 562-568. (E)

Preparation of lactose-silk fibroin conjugates and their application as a scaffold for hepatocyte attachment.

GOTOH Y., NIIMI S., HAYAKAWA T., MIYASHITA T.
Insect Biom. adn Tech. Dept., Nat. Inst. of Agrobiol. Sci., 1-2 Ohwashi, Tsukuba, 305-8634, Ibaraki, Japan.
2004 Biomaterials, Vol. 25(6), 1131-1140. (E)

Studies on multi x bivoltine cocoon cooking: effect of pressurised cooking conditions on reeling and quality characteristics.

HARIRAJ G., SOMASHEKAR T.H.
Central Silk Technological Research Institute, Central Silk Board, Bangalore 560068, India.
2003 Acta Sericologia Sinica, Vol. 29(4), 391-398. (E,c)

Human bone marrow stromal cell responses on electrospun silk fibroin mats.

JIN H.J., CHEN J., KARAGEORGIOU V., ALTMAN G.H., KAPLAN D.L.
Dept. of Chemical & Biological Engineering, Tufts University, 4 Colby Street, 02155, Medford, MA, USA.
2004 Biomaterials, Vol. 25(6), 1039-1047. (E)

Preparation and characterization of low molecular weight silk fibroin by high-temperature and high-pressure method.

KANG G.D., LEE K.H., SHIN B.S., NAHM J.H.
2002 J. Applied Polymer Science, Vol. 85(14), 2890-2895. (E)

Thermodynamics of adsorption of laccase acid on silk.

KONGKACHUICHAY P., SHITANGKOON A., CHINWONGAMORN N.
2002 Dyes and Pigments, Vol. 53(2), 179-185. (E)

Effect of methyl alcohol on the morphology and conformational characteristics of silk sericin.
LEE K., KWEON H., YEO J.H., WOO S.O., LEE Y.W., CHO C.S., KIM K.H., PARK Y.H.
Dept. of Sericulture and Entomology, National Institute of Agriculture and Technology, 441-100,
Suwon, South Korea.

2003 *Int. J. Biol. Macromol.*, Vol. 33(1-3), 75-80. (E)

Study of enzyme immunosensor immobilized by regenerated silk fibroin.

LI W., LI Y.R., PAN N.

2001 *Sheng Wu Gong Chen Xue Bao*, Vol. 17(6), 639-642. (C)

Morphological parameters in varieties of silk fibers determined by small-angle X-ray scattering.
LONDONO J.D., ANNADURAI V., URS R.G., SOMASHEKAR R.

2002 *J. Applied Polymer Science*, Vol. 85(11), 2382-2388. (E)

The ESR signals in silk fibroin and wool keratin under both the effect of UV-irradiation and without any external effects and the formation of free radicals.

MAMEDOV S.V., AKTAS B., CANTURK M., AKSAKAL B., ALEKPEROV V., BULBUL F., *et al.*

2002 *Biomaterials*, Vol. 23(16), 3405-3412. (E)

Optimization of dyeing variables for euphorbia leaves on silk.

RAWAT B., JAHAN S., YADAV S.

Department of Clothing & Textiles, Allahabad Agricultural Institute, AAI-Du, India

2003 *Indian Silk*, Vol. 42(7), 23-25. (E)

Surprising strength of silkworm silk.

SHAO Z., VOLLRATH F.

2002 *Nature*, Vol. 418, 741. (E)

Water-soluble polypeptides at aqueous interface produce extensible silk-like fiber.

TAKAHASHI Y., HACHISU M., OHKAWA K., YAMAMOTO H.

2002 *Macromolecular Rapid Communications*, Vol. 23(9), 540-543. (E)

Sulfation of silk fibroin by chlorosulfonic acid and the anticoagulant activity.

TAMADA Y.

National Institute of Agrobiol. Sci., Insect Biomaterials and Tech. Dept., 1-2 Owashi, Tsukuba,
305-8634, Ibaraki, Japan

2004 *Biomaterials*, Vol. 25(3), 377-383. (E)

Analysis of structural properties and formation of sericin fiber by infrared spectroscopy.

TERAMOTO H., miyazawa m;

New Silk Materials Lab., Nat. Inst. of Agro. Sci., Gohda 1-4-8, Okaya, Nagano 394-0021, Japan.

2003 *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, Vol. 72(3), 157-162. (E)

The role of formic acid in solution stability and crystallization of silk protein polymer.

UM I.C., KWEON H.Y., LEE K.G., PARK Y.H.

Department of natural Fiber Sciences, Seoul National University, 441-744, Suwon, South Korea.

2003 *Int. J. Biol. Macromol.*, Vol. 33(4-5), 203-213. (E)

Identification of fibroin-derived peptides enhancing the proliferation of cultured human skin fibroblasts.

YAMADA H., IGARASHI Y., TAKASU Y., SAITO H., TSUBOUCHI K.

National Inst. of Agrobiological Sci., Entomological Sci., 1-2 Owashi, Tsukuba, 305-8634, Ibaraki,
Japan.

2004 *Biomaterials*, Vol. 25(3), 467-472. (E)

Applications of natural silk protein sericin in biomaterials.

ZHANG Y.Q.

Biotechnology Lab. for Silkworm and Silk, Soochow University, 1 Shizi Street, 215006, Suzhou, China.

2002 Biotechnol. Adv., Vol. 20(2), 91-100. (E)

Copper in the silk formation process of *Bombyx mori* silkworm.

ZHOU L., CHEN X., *et al.*

2003 FEBS Lett., Vol. 554(3), 337-341. (E)

Genetically directed synthesis and spectroscopic analysis of a protein polymer derived from a flagelliform silk sequence.

ZHOU Y., WU S., CONTICELLO V.P.

2001 Biomacromolecules, Vol. 2(1), 111-125. (E)

Unique molecular architecture of silk fibroin in the waxmoth, *Galleria mellonella*.

ZUROVEC M., SEHNAL F.

2002 J. Biol. Chem., Vol. 277(25), 22639-22647. (E)

INFORMATION FOR CONTRIBUTORS

1) Papers should be in French or in English and be original contributions or reviews in the field of sericulture including silkworm, host plant, silk reeling, whatever the nature of studies (basic or applied) and topics (biochemistry, ecology, economy, virology, genetics, etc.).

2) Papers should be submitted to: **Dr G. CHAVANCY**. Submission of a paper to the Editor implies that it has not previously been published, that it is not under consideration for publication elsewhere and that, if accepted in *SERICOLOGIA*, it will not be published elsewhere in the same form without the written consent of the Editor.

3) Manuscripts and illustrations should be submitted in duplicate and the author should retain one copy. In the case of multiple ownership, the authors indicate who is to receive the proofs.

4) Manuscripts should be typewritten with double spacing and wide margin. Authors are requested to keep their communication as concise as possible. Footnotes should be avoided and italics should not be used for emphasis.

5) The typescript should contain the following features:

- Title followed by the author's name and full address.
- Abstract which should be a brief summary of the contents and conclusions of the paper and should refer to any new information. It should not exceed 200 words and may be divided into numbered sections.
- Keywords. A short list of keywords provided for rapid scanning of the contents of the paper and used for compiling the index.

- Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion should be given for papers presenting original results. For review, authors may choose the convenient presentation.

- Acknowledgements.

- References. The 'Harvard system' is to be followed. References should be detailed in the following order: author's names and initials, date (in parentheses), the title of the article, the name of the journal as abbreviated in the World List of Scientific Periodicals (4th edit., 1963), the volume and the first and last pages of the article.

For books, the author's names, date of publication, title, edition, number of pages, reference, publisher's name and the place of publication should be given.

In the text, references should be given as Dupont (1964) or (Dupont, 1964). When a citation includes more than two authors, e. g. Dupont, Durand and Martin, the paper should be cited in the text as Dupont *et al.*, provided this is not ambiguous. If papers by the same author(s) in the same year are cited they should be distinguished by the letters a, b, etc.

References to a paper "In press" means that it has been accepted for publication and given as follows:

SETOYAMA K. (1982) Effect of water on molecular motion of silk fibroin. *J. Seric. Sci. Jpn.* In press.

6) Illustrations. All necessary illustrations should accompany the manuscript but should not be inserted in the text. All photographs, graphs and diagrams should be numbered consecutively in Arabic numerals in the order in which they are referred to in the text.

Glossy photographs or positive prints (not X-ray, negatives or slides) should be sent, unmounted wherever possible, and should be restricted to the minimum necessary.

Charts, graphs or diagrams should be drawn boldly in black ink on good quality white paper or card. Lettering to appear on the illustration should be given in full and should be of sufficient size to allow for considerable reduction where necessary.

Illustrations should not be larger than 14 × 19 cm. On the back of each illustration should be indicated the author's name, the figure number (in arabic numerals) and the top of illustration, when it is not clear.

Legends to figures should be typed on a separate sheet and not on the back of the original, and should give sufficient data to make the illustration comprehensible without reference to the text.

7) Tables. They should be numbered in roman numerals, typed on separate sheets and should have a title which will make the meaning clear without reference to the text. All tables and figures would be referred to in the text.

8) Only standard abbreviations should be used. Where specialized abbreviations are used, the name should firstly be given in full with the abbreviation indicated in parentheses.

9) The Latin names should be given for all species used in investigation.

10) Corrections to proofs should be restricted to printer's errors only. Other than these, substantial alterations will be charged to the author.

11) A reprint order form will be supplied with the proofs, and authors may order such reprints as they require when the proofs are returned. Please note that 25 free reprints are sent by the Editor.

INSTRUCTIONS AUX AUTEURS

1) Les articles présentés doivent concerner soit des travaux originaux, soit des synthèses. Ils doivent être rédigés en français ou en anglais. Ils doivent avoir trait à la sériciculture qui inclut les vers à soie, les plantes nourricières, la filature de la soie quelle que soit la nature des recherches (fondamentales ou appliquées) et des sujets (biochimie, écologie, économie, virologie, génétique, etc.).

2) Les articles doivent être soumis à : **Dr G. CHAVANCY**. Les articles soumis au Rédacteur doivent être inédits et ne doivent pas être présentés pour publication chez un autre éditeur. Les articles acceptés pour publication dans *SERICOLOGIA* ne pourront être publiés ailleurs sous la même forme sans le consentement écrit de l'éditeur.

3) Les manuscrits et illustrations doivent être soumis en double exemplaire, l'auteur conservant une copie. Dans le cas d'une co-rédaction, les auteurs doivent indiquer le nom de celui qui recevra les épreuves.

4) Les manuscrits doivent être dactylographiés avec un double interligne et des marges importantes. Les auteurs sont priés de rédiger des communications aussi concises que possible. Les renvois de bas de page sont à éviter et les caractères en italique ne doivent pas être utilisés pour la mise en relief.

5) L'article doit être présenté de la façon suivante:

- Le titre suivi du nom de l'auteur et de son adresse complète.
- Le résumé qui doit indiquer le contenu et les conclusions de l'article et doit faire référence à des informations nouvelles. Le résumé ne doit pas excéder 200 mots et peut être divisé en paragraphes numérotés.
- Les mots clés. Une petite liste de mots clés permettant une rapide analyse du contenu de l'article et utilisable pour la compilation de l'index.

- Les articles doivent être divisés en : Introduction, Matériel et Méthodes, Résultats et Discussion. Pour les articles de synthèse, les auteurs peuvent choisir la présentation qui leur convient.

- Remerciements.

- Références. Les auteurs doivent suivre le "Harvard system". Les références doivent être données dans l'ordre suivant : nom de l'auteur et ses initiales, date (entre parenthèses), titre de l'article, nom du journal tel qu'il est abrégé dans la liste mondiale des périodiques scientifiques (4ème édit. 1963), le volume et les première et dernières pages de l'article.

Pour les livres, il est nécessaire d'indiquer le nom de l'auteur et ses initiales, la date de publication, le titre, l'édition, le nombre de pages, le nom de l'éditeur et le lieu d'édition.

Dans le texte, les références doivent être indiquées sous la forme suivante : Dupont (1964) ou (Dupont, 1964). Lorsque la référence comprend plus de deux auteurs, par exemple Dupont, Durand et Martin, l'article doit être cité comme Dupont et coll. sauf si cela peut prêter à confusion. Si l'on cite des articles d'un même auteur publiés la même année, ils doivent être distingués par les lettres a, b, etc.

La référence à un article sous presse doit signifier que l'article a été accepté pour publication et elle doit s'écrire de la façon suivante :

SETOYAMA K. (1982) Effect of water on molecular motion of silk fibroin. *J. Seric. Sci. Jpn.* Sous presse.

6) Illustrations. Le manuscrit sera accompagné de toutes les illustrations nécessaires mais celles-ci ne doivent pas être insérées dans le texte. Toutes les photographies, graphiques et diagrammes doivent être numérotés consécutivement en chiffres arabes, dans l'ordre de citation du texte.

Les photographies sur papier brillant, ou les épreuves positives (pas de négatifs ou de diapositives) doivent être envoyées si possible sans montage et en nombre limité.

Les cartes, graphiques ou diagrammes doivent être dessinés nettement à l'encre noire sur le papier ou du carton blanc de bonne qualité. Les inscriptions apparaissant sur les illustrations doivent être complètes et de taille suffisante pour permettre une réduction importante si nécessaire.

Les illustrations ne doivent pas dépasser le format 14 x 19 cm. Au dos de chaque illustration doivent être indiqués le nom de l'auteur, le n° de la figure (en chiffres arabes) et l'orientation de l'illustration si nécessaire.

Les légendes des figures doivent être dactylographiées sur une feuille séparée et non pas au dos de l'original et elles doivent être suffisamment explicites pour éviter que l'on se reporte au texte.

7) Tableaux. Ils doivent être numérotés en chiffres romains et dactylographiés sur des feuilles séparées. Les titres doivent être suffisamment clairs sans qu'il soit nécessaire de se reporter au texte. Tous les tableaux et figures doivent être cités dans le texte.

8) Seules les abréviations normalisées sont autorisées. Lorsque des abréviations particulières sont utilisées, le nom devra d'abord être donné en entier suivi de l'abréviation entre parenthèses.

9) Le nom latin de toutes les espèces étudiées doit être indiqué.

10) Les corrections des épreuves doivent se limiter aux fautes de frappe. Toutes modifications importantes de l'article seront facturées à l'auteur.

11) Un bon de commande de tirés à part est fourni en même temps que les épreuves. Les auteurs peuvent ainsi commander des tirés à part en renvoyant les épreuves. Il est à noter que 25 tirés à part sont envoyés gratuitement par l'éditeur.

